

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

**DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES DE RESISTENCIA A  
TETRACICLINA EN ADN PLASMÍDICO DE *Escherichia coli* EN  
MUESTRAS AMBIENTALES Y HUMANAS DE PANAMÁ.**

INDIRA ESTHER RAMÍREZ BAYARD  
DIRECTOR DE TESIS: ALEX O. MARTÍNEZ T.

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2016



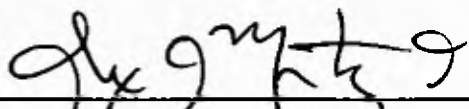
**Titulo de la Tesis "Detección molecular de genes de resistencia a tetraciclina  
en ADN plasmídico de *Escherechia coli* en muestras ambientales y humanas de  
Panamá"**

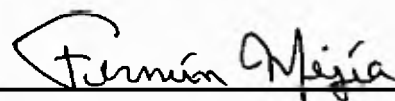
**TESIS**


**Sometida para optar al título de Maestría en Microbiología Ambiental**

**Vicerrectoría de Investigación y Postgrado  
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología**

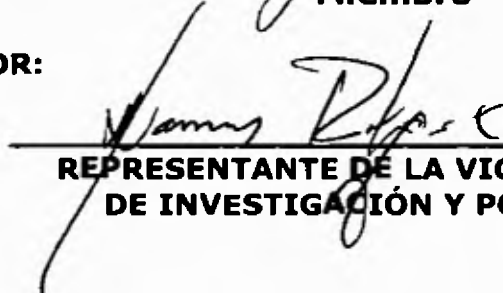
**APROBADO POR**

  
**Doctor Alex Martinez**  
**Presidente**

  
**Profesor Fermín Mejía**  
**Miembro**

  
**Profesora Olga Chen**  
**Miembro**

**REFRENDADO POR:**

  
**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA  
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

**FECHA:**

\_\_\_\_\_

**AGRADECIMIENTO**

Ante todo deseo agradecer a Dios por darme la fortaleza para terminar una nueva meta de mi vida. Al Dr. Alex O. Martínez Torres por todo el esfuerzo y tiempo dedicado en la asesoría de este trabajo, a los profesores Fermín Mejía, Humberto Cornejo, Sara Ahumada y Nidia Sandoval por sus sabios y atinados consejos en la asesoría, redacción y elaboración de mi tesis.

A los profesores Blanca Hernández y Juan A. Jaén, por su apoyo logístico en la confección y sustentación del trabajo final.

A la Dra. Magaly de Chial y a la Licenciada Criseida Aguilar por facilitarme el uso del fotodocumentador cuando no había en el laboratorio.

A todos aquellas personas que me dieron el apoyo moral y espiritual para lograr la terminación de este trabajo.

obsequio

**DEDICATORIA**

A mi madre, Ana Bayard, mis hermanas, mis sobrinas y mi abuela Rosa, por ser tan pacientes y siempre darme buenos consejos, los que me han llevado hasta donde estoy hoy día

A mi esposo Luis Camaño, quien con todo su esfuerzo, amor y dedicación, me apoyo y dio ánimos en los momentos más difíciles. Le doy gracias a Dios por haberte cruzado en mi camino, ya que sin tu ayuda y motivación diaria, no hubiera culminado esto

A mis profesores asesores, amigos y todas las personas que de una u otra forma estuvieron pendientes de que concluyera este momento de mi vida. Mil gracias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
 <b>INTRODUCCIÓN.....</b>	 <b>5</b>
 <b>REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	 <b>10</b>
1 Antibiótico-antimicrobiano	11
1 1 Resistencia antimicrobiana	12
1 2 Tetraciclinas	13
1 2 1 Mecanismo de acción.	16
1 2 2 Mecanismos de resistencia	17
2 Historia de <i>E. coli</i>	18
2 1 Características generales de <i>E coli</i>	18
2 2 Mecanismo genético de resistencia en <i>E coli</i>	20
2 3 Detección molecular de genes de resistencia en <i>E coli</i>	22
3 El uso de PCR en la detección de genes de tetraciclina	27
3 1 PCR múltiple en la detección de genes de resistencia	28
 <b>OBJETIVOS.....</b>	 <b>29</b>
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	 <b>31</b>
1 Cultivos bacterianos	32
2 Extracción de ADN plasmídico.	32
3 Electroforesis para la detección de plásmidos en cepas de <i>E coli</i> .	33
4 Estandarización de PCR múltiple para la detección de los genes <i>tet A</i> y <i>tet B</i> , resistentes a la tetraciclina	33

<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
Determinación de la presencia de plásmidos en muestras retrospectivas de <i>E coli</i> pertenecientes a LAMEXA, Universidad de Panamá	36
Detección de genes de resistencia <i>tet A</i> y <i>tet B</i> al antibiótico tetraciclina en muestras de ADN plasmídico de <i>E coli</i> por la técnica de PCR múltiple	41
Resistencia y genes de resistencia ( <i>tet A</i> y <i>tet B</i> ) para el antibiótico tetraciclina presente en las muestras de <i>E coli</i> en diferentes fuentes de muestreo	45
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>58</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema donde se muestra algunos grupos de antibióticos usados como quimioterapias y que alteran la síntesis proteica ribosomal	12
<b>Figura 2.</b> Estructura química de algunos miembros de la familia de las tetraciclinas	14
<b>Figura 3.</b> Gel de agarosa al 1,5% que muestra los resultados de la electroforesis realizada después de la extracción de ADN plasmídico en los aislamientos de <i>E. coli</i> procedentes de las diferentes fuentes de muestreo de este estudio	39
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de prevalencia de plásmidos obtenidos en cada uno de los sitios de colecta	40
<b>Figura 5.</b> Prevalencia de plásmidos en las diferentes fuentes de muestreo colectadas en las tres localidades del estudio	40
<b>Figura 6.</b> Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5% después de realizar la PCR múltiple para confirmar la presencia o ausencia de los genes de resistencia <i>tet A</i> y <i>tet B</i>	43
<b>Figura 7.</b> Prevalencia de los genes de resistencia <i>tet A</i> y <i>tet B</i> en las diferentes fuentes de muestreo colectadas en las tres localidades estudiadas	44
<b>Figura 8.</b> Cantidad de muestras resistentes a la tetraciclina por fuente de muestreo y sitio de colecta	46

**ÍNDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro 1.</b> Genes que codifican los diferentes mecanismos de resistencia a las tetraciclinas	22
<b>Cuadro 2.</b> Cebadores usados en este estudio para la amplificación de los genes <i>tet A</i> y <i>tet B</i>	34
<b>Cuadro 3.</b> Plásmidos y genes de resistencia ( <i>tet A</i> y <i>tet B</i> ) que se obtuvieron en las diferentes muestras de los sitios de colecta	37
<b>Cuadro 4.</b> Cantidad de plásmidos obtenidos en las tres comunidades de acuerdo a la fuente de muestreo	39
<b>Cuadro 5.</b> Genes de resistencia a tetraciclina que se detectaron en las tres comunidades del estudio mediante la técnica de PCR múltiple	44
<b>Cuadro 6.</b> Comparación de los valores de genes de resistencia por lugar obtenidos al aplicar la PCR múltiple	46



# ***RESUMEN***

Las enterobacterias, en especial la *Escherichia coli* (*E. coli*), están manifestando una creciente resistencia a antibióticos, provocando un impacto a nivel mundial. El monitoreo de la flora fecal es importante porque es un reservorio potencial para bacterias resistentes y es un lugar donde se puede facilitar la transferencia de genes entre bacterias comensales y microorganismos virulentos. De igual manera se han reportado bacterias con resistencia antimicrobiana en aguas residuales y de uso agrícola o sumideros de distribución. Utilizando la técnica de PCR múltiple se estandarizó una metodología para detectar genes de resistencia a tetraciclina (*tet A* y *tet B*) en plásmidos de muestras ambientales y humanas de *E. coli* provenientes de tres localidades de Panamá. De las 132 muestras analizadas, se obtuvo que el 67,4%, presentaron plásmidos. El 62,9% (56 de 89) de las cepas con plásmidos presentaron genes de resistencia, identificándose en total 73 genes entre *tet A* y *B*. La mayor prevalencia de genes de resistencia fue en el gen *tet A*, seguido del gen *tet B*, cuyos valores corresponden al 72,6% (53/73) y 27,4% (20/73) de las muestras, respectivamente. Para la presencia de plásmidos y genes de resistencia se observa el mismo patrón de prevalencia, los valores más altos se encontraron en la comunidad de Ciudad del Niño, después en El Escobal y por último en El Árado. El mecanismo de acción que ejerce la resistencia a antibióticos en las bacterias es aún desconocido, por esta razón, este trabajo tuvo como objetivo aportar por primera vez en Panamá una investigación sobre la participación que tienen los plásmidos y los genes de resistencia de tetraciclina en muestras de *E. coli* colectadas en diversas fuentes.

# ***SUMMARY***

The Enterobacteriaceae, in special *E. coli*, are manifesting a high tetracycline antibiotics resistance, causing global impact. The fecal flora monitoring is important because it is a potential reservoir of resistant bacteria and is a place where you can facilitate the genes transference between commensal and virulent bacteria. Similarly, there are reports about bacteria with antimicrobial resistance in sewage waters and for agricultural use or distribution drains. Was standardized the PCR multiplex for detect genes of resistance a tetracycline (*tet A* and *tet B*) in plasmids of environmental and humans *E. coli*, in three localities of Panamá. Of the 132 samples analyzed, 67,4% hold plasmids. The 62,9% (56 of 89) of *E. coli* with plasmids have resistance genes, identified 73 genes in total. The high prevalence of resistance genes was in the gen *tet A*, followed by the gen *tet B*, with values that correspond at 72, 6% (53 of 73) and 27,4% (20/73), respectively. For the plasmids presence and resistance genes was seen the same prevalence pattern, the high values find in the Ciudad del Niño community, after in El Escobal and finally, El Árado. The action mechanisms of resistance experimented in the bacteria is still unknown, for this reason, this work was realized for first time in Panamá to provide the participation of the plasmids and resistance genes in *E. coli* collected in several sources.

# ***INTRODUCCIÓN***

La resistencia antimicrobiana es una capacidad de la bacteria para resistir a los efectos causados por un antibiótico. La resistencia se adquiere de manera natural por medio de mutaciones al azar o puede inducirse artificialmente por medio de una presión selectiva en una población (52, 77, 91)

La resistencia a antibióticos ha pasado de ser un problema individual a uno de salud mundial (57, 65), ya que se ha demostrado en algunos estudios que los aislamientos que se obtienen de muestras clínicas o ambientales, presentan resistencia a los antibióticos que se utilizan con mayor frecuencia, entre estos tenemos ampicilina, tetraciclina, cloramfenicol, ácido nalidixico, entre otros (5, 37, 52, 65, 77). Esta resistencia se manifiesta por el uso indiscriminado del antibiótico y el descuido humano (incumplir la dosis o el horario prescrito, el abusar de su uso o automedicarse), lo que ha provocado repercusiones económicas, sociales y políticas a nivel mundial (56, 57, 82). Esto trae como consecuencia complicaciones al momento de aplicar un tratamiento ya que la resistencia impide una respuesta del antimicrobiano, a la vez que se aumentan los costos por aplicaciones más largas de medicamentos o estadías hospitalarias (52, 55)

La resistencia bacteriana es una adquisición que se desarrolla por la presión evolutiva, ya que estas bacterias son comensales del hombre y otros animales de sangre caliente, pero se ha descubierto que algunos serogrupos pueden causar enfermedades (26, 39, 65). Estos microorganismos presentan un intercambio de genes, facilitado por mecanismos moleculares que permiten mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies iguales o diferentes, a la vez que actúan como reservorios de genes con resistencia (52, 86)

Las bacterias resistentes están muy bien documentadas en el aislamiento de muestras provenientes de animales de granjas o silvestres (5, 20, 22,

87) Pero otro medio de propagación son las aguas residuales, las mismas pueden provenir de desechos hospitalarios y de cloacas urbanas o suburbanas (54, 91)

Como la relación entre el antibiótico y la bacteria se ve afectada por múltiples factores como lo son la farmacocinética de la droga, la duración del tratamiento y el tamaño del inóculo bacteriano, ha surgido la necesidad de optimizar el uso de los fármacos, por lo que se realizan supervisiones periódicas para observar los patrones de resistencia y aplicar políticas de control a nivel mundial (52)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde inicios del siglo XXI ve la urgencia que se da por el uso de antibióticos en animales que son alimento del hombre, debido a que se da la transmisión de enfermedades de animales a humanos, por lo cual, brinda medidas para controlar el uso inadecuado de los antibióticos. Surge de esta manera en el 2001, un plan de vigilancia con estrategias globales para la contención de la resistencia antimicrobiana (AMR-*antimicrobial resistance*, por sus siglas en inglés) (55, 57, 59)

En el 2012, la OMS informa que hay genes involucrados en el intercambio genético entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, dificultando aún más las medidas a tomar para controlar las enfermedades que causan ambos grupos de bacterias de forma individual. Se aplica vigilancia *in vivo* o *in vitro* para el monitoreo de la resistencia. El monitoreo *in vivo*, se aplica para pruebas terapéuticas, mientras que *in vitro*, se realiza a través de estudios fenotípicos o moleculares en laboratorios. Este último método, conocido como vigilancia molecular, es el futuro de la vigilancia de la resistencia ya que se basa en la identificación de los genes que codifican los mecanismos de resistencia en las bacterias. Aunque se conoce que los genes brindan resistencia ante un antibiótico específico, puede darse también la resistencia cruzada, en la cual se afectan otros antibióticos con el mismo

mecanismo de acción, incluyendo a los de la misma clase o familias diferentes. Así mismo, estos genes de resistencia se pueden asociar en una misma estructura genética, lo que brinda a la bacteria una co-selección ante un antimicrobiano. Conocer todos estos mecanismos, contribuye a la toma de decisiones que ayudan a controlar la diseminación de estos genes (52).

Las enterobacterias tienen un gran impacto en la salud mundial y en Europa se realizan programas para el monitoreo zoonótico para contrarrestar los problemas de enfermedades por consumo de carne contaminada con genes de resistencia (22, 87). Las revisiones literarias mencionan en gran medida la resistencia desarrollada en *E. coli*, la cual es una bacteria Gram negativa comensal de la microbiota intestinal y se puede encontrar como saprófita en el medio externo, en estos casos no se comporta como microorganismo patógeno, pero pueden darse situaciones adversas en donde la bacteria puede ser causante de cuadros clínicos extra e intestinales (23,39). La actual tendencia de resistencia antimicrobiana ha llevado a la inclusión de esta bacteria en el programa de vigilancia para contrarrestar AMR (58). Este programa realiza el monitoreo de muestras de diversos países a fin de permitir una observación anual del comportamiento microbiano e implementar medidas para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana.

Las publicaciones son muchas en el mundo, pero para América Latina son pocas, y en esta región, la práctica de utilizar antibióticos no es completamente regulada, además, el antibiótico más utilizado e identificado en los estudios es la tetraciclina (59). Por esta razón, es necesario revisar los mecanismos de resistencia de estas bacterias para brindar un apoyo científico a los microbiólogos, médicos, epidemiólogos, y personal relacionado con los sistemas de salud pública, para proporcionar información actualizada de lo que ocurre en nuestra región e interpretar mejor los resultados de la literatura que se publica.



En Panamá, son varias las campañas para concientizar a la población sobre el manejo adecuado de los tratamientos antimicrobianos pero pocos los estudios que demuestran como el uso inadecuado de los antibióticos tiene repercusiones importantes en la salud de la población. Entre las campañas que se manejan podemos resaltar que actualmente pertenecemos a una estrategia de monitoreo anual donde se estudian cepas comunitarias y hospitalarias, con la finalidad de determinar la resistencia a antibióticos. El propósito es mantener, mejorar y asegurar la calidad de los procedimientos en el manejo de material biológico y ser agentes de vigilancia epidemiológica e infecciones. Esta red incluye a varios países de la Región de las Américas, la estrategia se denomina Red Nacional de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos y participan países como Paraguay, Colombia, Argentina, Chile, Costa Rica, entre otros. En Panamá, está conformada por 24 laboratorios de hospitales, pertenecientes a instituciones públicas y privadas de todo el país. Cada país tiene un laboratorio coordinador y en nuestro caso, lo dirige el Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública (LCRSP) del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) (58). De igual forma, el Ministerio de Salud mantiene medidas para disminuir el riesgo de enfermedades, debido a que somos un país de constante tránsito (18). Para este estudio, el antibiótico utilizado es la tetraciclina porque es de amplio uso, tanto en humanos como en veterinaria y además, porque no se aplica como tratamiento de *E. coli*. Se eligió esta bacteria porque brinda muchas ventajas, está ampliamente asociada a la flora bacteriana intestinal de los animales y los requerimientos de crecimiento son mínimos, también se utiliza en el monitoreo ambiental como indicador de contaminación fecal (20, 40).

***REVISIÓN DE  
LITERATURA***

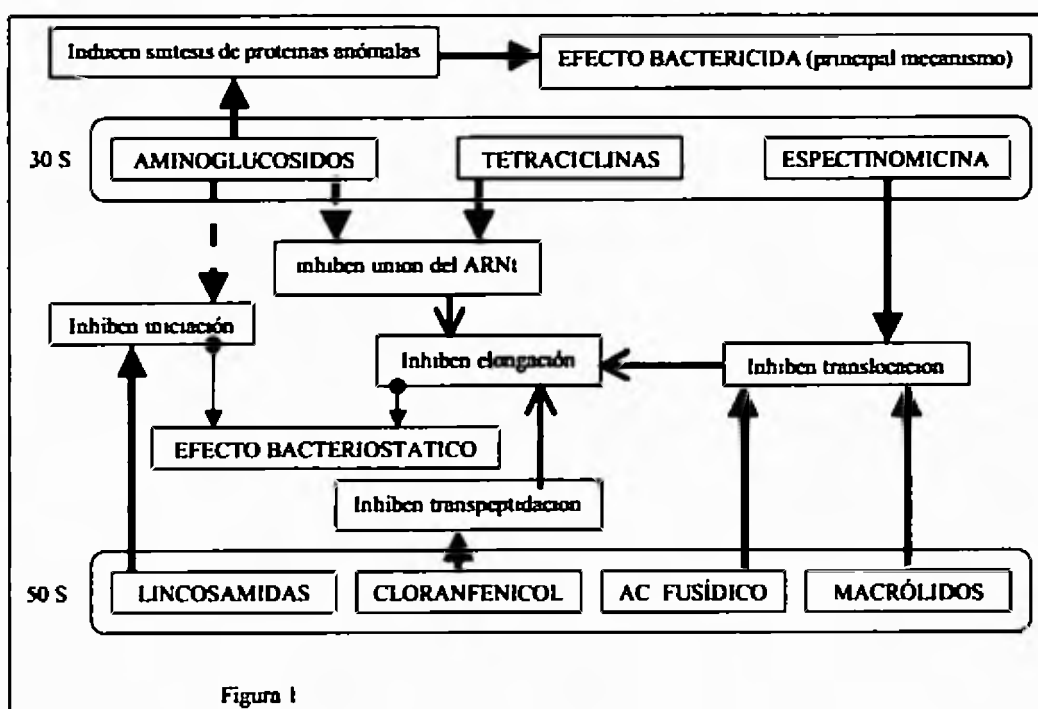
### **1. Antibiótico - Antimicrobiano**

Los antibióticos son sustancias químicas de bajo peso molecular producidas por seres vivos o sus derivados sintéticos, que a pequeñas dosis, tienen efectos antimicrobianos (microbicidas o microbiostáticos), tras ser administrados por vía adecuada a un organismo receptor (31). La mayoría, se obtiene por el metabolismo secundario de microorganismos procariotas como actinomicetos y *Bacillus* sp, o eucariotas como los hongos (*Penicillium* sp. y *Cephalosporium* sp). Se utilizan para tratar enfermedades causadas por bacterias, aunque algunos se usan contra hongos y levaduras, y unos pocos presentan actividad antitumoral.

Una gran parte de los antibióticos son moléculas complejas, con regiones hidrofóbicas que facilitan el transporte al interior celular. Muchos poseen varios anillos, algunos de los cuales mejoran la interacción de la molécula con su sitio diana. Los antibióticos se clasifican según el efecto que ejerzan en el sitio diana y no por su naturaleza química, esto ha permitido clasificarlos en cuatro grupos:

- Interferencia en la síntesis de la pared celular
- Actúan sobre la membrana celular
- Inhibición de la síntesis de proteínas.
- Actúan sobre la síntesis de ácidos nucleicos

Los antibióticos más abundantes y estudiados son los que interfieren con la formación del peptidoglicano y la síntesis de proteínas.



**Figura 1.** Esquema donde se muestra algunos grupos de antibióticos usados como quimioterapias y que alteran la síntesis proteica ribosomal Tomado de Vives y col , 2004 (85)

### 1.1. Resistencia antimicrobiana

Los antibióticos ayudan a la prevención y control de enfermedades, pero también influyen en el rápido crecimiento de los animales, abaratando los costos en el mercado para lograr un mejor precio al consumidor (70) El uso inadecuado y prolongado en los tratamientos de salud pública, veterinarios y la falta de seguridad en el tratamiento de los desechos de la industria farmacéutica, han influido en la presión selectiva natural de las bacterias, permitiendo la adquisición de resistencia a los antibióticos (30)

La resistencia a antibióticos es un problema que cada día tiene mayor importancia a nivel mundial, debido a las altas tasas de morbilidad y mortalidad, que implican consecuencias sociales y económicas por su alto costo en tratamientos y largas estadías hospitalarias (29, 52, 77, 78)

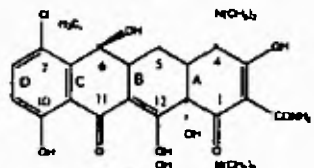
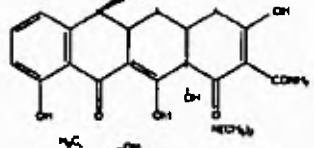
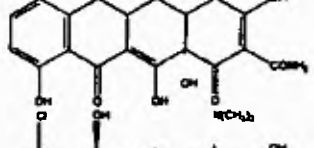
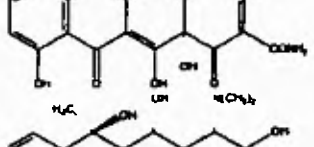
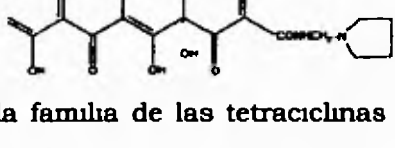
Se considera que actualmente nos encontramos ante una alta resistencia que es causada por el abuso en el consumo de los antibióticos, que incluye el uso humano, veterinario y agrícola (5, 28, 49, 87) El uso inadecuado en los tratamiento no solo afecta a la bacteria patógena específica, sino que también al complejo de comunidades microbianas que habitan en la piel y membranas mucosas, provocando infecciones extraintestinales que pueden permanecer por largos periodos de tiempo y ser transferidas a través de elementos de resistencia a otros miembros de la microbiota (39, 65)

## 1.2. Tetraciclinas

La primera tetraciclina surge en 1948 cuando Duggar buscó muestras de antibióticos en suelos Se extrajo a partir de un cultivo de *Streptomyces aureofaciens*, y se denominó aureomicina (clorotetraciclina) Posteriormente, a partir de un mutante de este se obtuvo la demeclociclina En 1950, Finlay y col (51) aislaron de un cultivo de *Streptomyces rimosus*, la oxitetraciclina. Minieri y col en 1953 (51), obtuvieron la tetraciclina a partir de cepas de *Streptomyces alboniger* o *texasi* Todas estas tetraciclinas se consideran de primera generación porque se obtuvieron a partir de cepas de *Streptomyces*

A partir de éstas se han obtenido compuestos semisintéticos, considerados de segunda generación, los cuales presentan mayor liposolubilidad y vida media, así como mejor absorción intestinal. Podemos mencionar a la doxiciclina y la minociclina Las glicilciclinas son las de tercera generación y son las más recientes (51)

La estructura básica es tetracíclica con un núcleo naftacen-carboxamídico de carácter anfotérico El nombre deriva de su estructura de cuatro anillos bencénicos fusionados Los diferentes representantes de este grupo se diferencian entre sí por los radicales que contiene el grupo químico básico (51, 85)

Chemical name	Structure
7-Chlortetracycline	
5-Hydroxytetracycline	
Tetracycline	
6-Demethyl 7-chlortetracycline	
2-N Pyrrolidinomethyltetracycline	

**Figura 2.** Estructura química de algunos miembros de la familia de las tetraciclinas  
Tomado de Chopra y col , 2001 (17)

Uno de los antibióticos que más se ha usado a nivel mundial es la tetraciclina (30, 37) y desde su uso a partir de 1953 (32, 60), se produjo a mayor escala, en referencia a otros antibióticos, porque se usa en la medicina humana y veterinaria, así como también se emplea como un factor de crecimiento en las crías de animales. Hoy día la resistencia que se presenta al mismo, ha provocado la disminución de su espectro de acción, por lo que se hace uso de antibióticos de segunda y tercera generación (51). A pesar de que no se usa como tratamiento para las infecciones causadas por *E. coli* en los seres humanos porque clínicamente presenta una alta susceptibilidad, su alta resistencia sugiere que la transferencia se ha dado por estar presente en la flora intestinal al momento de aplicar un tratamiento a otros patógenos en seres humanos y animales (39).

Es considerado un bacteriostático de amplio espectro, utilizado en un gran número de bacterias Gram positivas (+) y negativas (-) En altas concentraciones puede ser bactericida. Se utiliza para el tratamiento de infecciones producidas por *Brucella* sp , *Mycoplasma* sp , *Rickettsia* sp y *Chlamydia* sp Su administración más frecuente es por vía oral, no se administra de manera intramuscular por el intenso dolor que produce su inyección y por intravenosa puede producir flebitis Se absorben bastante bien en el tracto gastrointestinal, aunque de manera incompleta ya que depende del tipo de tetraciclina (51, 60)

Su absorción en el cuerpo es de 75 a 80% y su unión a las proteínas oscila entre un 20 a 65%, mientras que para la Clortetraciclina la absorción es baja (30%), y en el caso de la Doxyciclina y Minociclina es de 90 a 100%, y su unión a proteínas es de 60 a 95% y 55 a 76%, respectivamente (51) La dosis que se recomienda oscila entre 1,5 a 4,0 µg/ml y hay reportes donde se menciona que la concentración plasmática máxima es de 2 a 2,5 µg/ml, equivalente a una dosis oral de 250 mg (67)

Su difusión en los tejidos y líquidos, como humor acuoso, lágrimas y saliva, es amplia debido a su gran liposolubilidad pero se dificulta en el cerebro, debido a que se metaboliza en el hígado Es un antibiótico de vida corta, dura entre 5 a 8 horas (h) dentro del organismo, ya que su excreción es estrictamente renal, a través del filtrado glomerular y por la bilis (85) Otros miembros de la familia pueden ser expulsados por las heces (51).

Su mayor absorción es en ayuna, pero puede administrarse con alimentos para disminuir los problemas gástricos Se debe evitar tomarla con leche y medicamentos, como los antiácidos, porque forma compuestos insolubles de Ca, Fe, Zn, Mg, Al y Bi, y pierden su actividad Disminuyen el efecto de los anticonceptivos orales y cuando se

administran conjuntamente con warfarina, es necesario un monitoreo estricto, ya que potencian la anticoagulación (51)

Entre sus efectos, se puede mencionar que produce irritación intestinal que se manifiesta como malestares epigástricos, pirosis, náuseas, vómitos, diarreas, gastritis y enterocolitis, y puede inhibir la síntesis de proteínas en eucariontes en altas concentraciones (67), aunque carece de significación clínica en los pacientes con función renal normal (85)

Alcanza concentraciones terapéuticas en el pulmón, vía biliar, hígado y riñón, así como en las cavidades serosas. Su efecto más tóxico es por la acumulación en huesos y dientes, por la formación de quelatos con el  $\text{Ca}^{++}$ , causando problemas de calcificación en lactantes y niños, lo que retarda su crecimiento. También, les tiñe de amarillo los dientes, por lo que no se recomienda su uso en niños menores de 8 años (51). De igual manera, no se recomienda su aplicación en embarazadas porque atraviesan la barrera feto-placentaria y se excreta habitualmente en elevadas concentraciones en la leche materna (60). Además, puede provocar cataratas congénitas en el recién nacido. En pacientes con función renal disminuida, puede producir uremia prerrenal. Se da la disminución de la vitamina K por destrucción de la flora intestinal, lo que puede llevar a un estado de hipoprotrombinemia (48)

### **1.2.1. Mecanismo de acción**

Este antibiótico es de segunda elección por los problemas de toxicidad y la resistencia que se presenta cada vez más. Ejerce su acción atravesando rápidamente la membrana externa de las bacterias a través de poros hidrofílicos, formados por las porinas OmpF y OmpC, y llega al citoplasma gracias a un mecanismo de transporte activo que crea un gradiente de protones por el efecto quelante del antibiótico con iones  $\text{Mg}^{2+}$  (17, 32, 67)



Ya en el citoplasma, el complejo tetraciclina- $Mg^{2+}$ , se une a los residuos fosfatos de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, causando la interferencia en la síntesis de proteínas por alteración e inestabilidad de la unión al complejo inicial 30S. El antibiótico inhibe específicamente, la unión del sitio aminoacil del ARN de transferencia (ARNt) al sitio A del ribosoma, superponiéndose en este punto la parte 16S de la subunidad 30S, de esta forma se bloquea la entrada a este sitio y se impide la adición de nuevos aminoácidos en la cadena peptídica. Esta acción es reversible, por lo cual, se le considera un bacteriostático (32, 52, 60).

Por su efecto quelante con  $Mg^{2+}$ , también puede inhibir algunas funciones enzimáticas de la bacteria, como los implicados en la fosforilación oxidativa (11), aunque no inhibe la hidrólisis del GTP necesario para la unión del aminoacil-ARNt al complejo ribosoma-ARN mensajero (ARNm), ya que éste es catalizado por enzimas de la fracción 50S (85).

### **1.2.2. Mecanismo de resistencia**

La resistencia por parte de los organismos procariotas es muy común (88). Puede ser natural o adquirida, ya que en los procariotas, todos contribuyen a un mismo acervo genético (36). Vives y col (2004) (85), hace mención de que al seleccionar este antibiótico y administrarlo en dosis sub-terapéuticas (inferiores a la dosis mínima inhibitoria) al ganado, se produce un mejor engorde para el consumo humano porque disminuye la adhesión de *E. coli* a las paredes epiteliales, pero al mismo tiempo bacterias que resisten estas dosis pueden transferir su resistencia a otras bacterias.

En el caso de la tetraciclina, se relaciona con inactivación enzimática, modificación del sitio diana realizado por proteínas ribosomales y pérdida de la capacidad para concentrar el antibiótico ya sea por un proceso de ingreso a la célula lento (disminución de la síntesis de porinas) o por la

aceleración de su salida a través de bombas de eflujo (85) Para las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Gram + y Gram -), las bombas de eflujo y la protección ribosomal son los mecanismos más utilizados (36)

Con las bombas de eflujo, la resistencia principalmente está mediada por un bombeo activo dependiente de energía, asociada a plásmidos que transportan los genes *tet* y causan la mutación de las porinas en la membrana citoplasmática, provocando que estas intercambien un protón por un complejo Tetraciclina-cation ( $Mg^{2+}$ ), dando como resultado la disminución en la acumulación de tetraciclina intracelular respecto al medio externo de la célula bacteriana, protegiendo así los ribosomas (32, 60, 77, 80) También, se ha descrito en algunas bacterias la existencia de actividades enzimáticas que degradan al antimicrobiano (49)

La protección ribosomal se debe a proteínas que permiten actuar al aminoacil ARN-transferasa en presencia de concentraciones de antibiótico que normalmente inhibirían la síntesis de éstas (60)

## **2. Historia de *E. coli***

Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore Von Escherich, quien la denominó *Bacterium coli commune* porque se aislaba tanto de individuos sanos como enfermos No fue sino hasta que la taxonomía le adjudicó el nombre de *E coli*, en honor a su descubridor (26)

### **2.1. Características generales de *E. coli***

La colonización inicial por *E coli* se da desde que el bebé está pasando por el canal de parto de la madre y si es por cesárea, el recién nacido alcanza los niveles regulares de concentración ( $10^8/ml$ ) a las cuatro semanas, igual a los que nacieron por parto natural (26)

La *E. coli*, es la bacteria facultativa más común de la flora intestinal de humanos y animales, considerado un comensal de la flora intestinal de animales de sangre caliente y algunos de sangre fría (8, 49)

Es un bacilo Gram -, de la familia *Enterobacteriaceae* y del género *Escherichia*, el cual incluye 7 especies *E. adecarboxylata*, *E. alberti*, *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* y *E. vulneris*, siendo la *E. coli*, la más conocida (26). Algunas especies no son móviles y otras poseen flagelos peritricos, no forma esporas y es capaz de fermentar glucosa y lactosa. Además de ayudar con el proceso digestivo, aporta las vitaminas B y K, las cuales no son sintetizadas por el organismo (26, 79)

A pesar de ser inofensiva, la alta frecuencia de intercambio genético ha facilitado el desarrollo de factores de virulencia en algunos serogrupos que causan patogenicidad al hospedador. Estos factores pueden ser fimbrias P, adhesinas, compuestos que atrapan hierro y hemolisina, los cuales provocan infecciones del tracto urinario, septicemia neonatal, síndrome urémico hemolítico, meningitis, colitis hemorrágica, cistitis, y diarrea aguda (19, 23, 80). A la vez, contribuyen también a la persistencia de la bacteria en el colon (39).

Recientes estudios utilizan a esta bacteria en el monitoreo del uso de fármacos como medida de control de la resistencia antimicrobiana, por su alta facilidad de reproducción y bajo costo, y fácil diseminación en diferentes ecosistemas (5, 19, 20, 40, 52). También, es un microorganismo que está muy asociado a infecciones en humanos y animales, y además, es utilizado como un indicador de calidad microbiológica del agua y alimentos (8, 20, 40, 78, 87)

Se propagan a través del agua, alimentos contaminados o personas infectadas con alguna cepa virulenta. El método más común de transmisión, es por el consumo de alimentos que contienen la bacteria. Entre los alimentos de riesgo están las carnes de res mal cocida, verduras que se riegan o lavan con agua contaminada y los productos

lácteos o jugos no pasteurizados. Incluso, puede contagiarse de una persona a otra si no se lavan las manos, al tocar las superficies o nadar en aguas contaminadas (27)

## **2.2. Mecanismo genético de resistencia en *E. coli***

La biología molecular permite realizar estudios más precisos que los métodos fenotípicos, a través de pruebas sensibles y específicas (24, 84) Diversos estudios han demostrado que la resistencia a antibióticos en bacterias puede ser causada por la transferencia de determinantes genéticos entre animales, de animales a humanos o incluso al ambiente, tomando en consideración que las rutas de transmisión pueden ser de reservorios ambientales como aguas subterráneas y superficiales, así como también estar implicado en la cadena alimentaria, a través del consumo de productos cárnicos y sus derivados (1, 5, 20, 22, 40, 70) A pesar de que a los niños no se les debe administrar tetraciclina, Karami y col (2006) (39), encontraron genes de resistencia a tetraciclina en cepas de *E. coli* presentes en la microbiota de neonatos nacidos en Suecia En los casos antes mencionados, se considera al ser humano un reservorio de genes de resistencia a antibióticos (52, 65), inclusive se ha observado la transferencia entre bacterias comensales del tracto digestivo (5, 8, 20, 70) La transferencia y recombinación de estos determinantes genéticos puede ser por una conjugación facilitada a través de elementos móviles como plásmidos, transposones e integrones, lo que ha permitido, con los años, que estudios demuestren una alta asociación a la resistencia de antibióticos (32, 60, 62, 86)

Uno de los mecanismos de transferencia horizontal de genes más estudiados son los plásmidos, estos son moléculas extracromosomales de ADN circular bicatenario útiles como marcadores y para darle seguimiento a cepas indistinguibles de bacterias de una misma especie o distintas, por los métodos de tipificación tradicionales (84)

La presencia de plásmidos, es un mecanismo de evolución, producto de la presión selectiva en que se encuentran los microorganismos debido al impacto ecológico causado por el hombre en el uso de los antibióticos (39, 72), y guarda estrecha relación con la resistencia a los antibióticos como ampicilina y tetraciclina (5, 20, 28, 52, 87) Las bacterias Gram - a menudo, llevan determinantes genéticos de antibióticos que codifican toxinas, que le brindán un fenotipo resistente a multidroga (32)

Los determinantes genéticos presentes en la resistencia a tetraciclina, se asocian a integrones presentes en plásmidos conjugativos (32, 62, 78) y los genes que participan son *tet* y *otr* (60) El primer estudio sobre bombas de eflujo para tetraciclina fue en 1953, identificado en *Shigella dysenteriae* y la protección ribosomal, fue en *Streptococcus sp*, pero ahora se conoce que hay una alta prevalencia de ambos mecanismos, tanto en bacterias Gram + como Gram - (80)

En el caso de codificación de proteínas para bombas de eflujo participan los fenotipos Tet A, Tet B, Tet C, Tet D, Tet E, Tet G, Tet H, Tet I, Tet K, Tet L, Tet Y, y algunos con nomenclatura numérica, como el Tet 30, Tet 31, Tet 35 y Tet 39 (Cuadro 1), en bacterias Gram -, siendo la mayoría entéricas facultativas (17, 32, 39, 49, 52, 60, 62, 80) Para la protección ribosomal se conoce la participación primaria del Tet M y generalmente, están asociados a transposones conjugativos (32, 52, 60)

**Cuadro 1.** Genes que codifican los diferentes mecanismos de resistencia a las tetraciclinas. Tomado de Mosquito y col., 2011 (52).

<b>Genes/ mecanismo de resistencia antibiótica</b>
<b>Bombas de eflujo</b>
<i>tet (A), tet (B), tet (C), tet (D), tet (E), tet (G), tet (H), tet (I), tet (J), tet (Z), tet (K), tet (L), tet (V), tet (Y)</i>
<i>tet (30)<sup>1</sup>, tet (31)<sup>1</sup></i>
<i>otr (B)<sup>2</sup>, tcr3<sup>2</sup></i>
<i>tetP (A)<sup>3</sup></i>
<b>Protección ribosomal</b>
<i>tet (M), tet (O), tet (S), tet (W), tet (Q), tet (T)</i>
<i>otr (A)</i>
<i>tetP (B)<sup>3</sup>, te<sup>2</sup></i>
<b>Modificación enzimática</b>
<i>tet (X)</i>
<b>Mecanismos no descritos</b>
<i>tet (U), otr (C)</i>

Adaptado de: Chopra 2001 <sup>(27)</sup>.

<sup>1</sup> Primeros genes con nomenclatura de números <sup>(28)</sup>.

<sup>2</sup> Genes que según la nomenclatura de Levy no cambiaron de nombre.

<sup>3</sup> Genes que siempre se encuentran juntos, por lo que se cuentan como un solo gen.

### 2.3. Detección molecular de genes de resistencia en *E. coli*

Los genes *tet A* hasta *tet E* son los de mayor frecuencia, pero los genes *tet A* y *tet B* son los más reportados en los estudios de flora intestinal y extraintestinal de *E. coli* (30, 40, 80).

Todos estos genes se han detectado en estudios que van desde el análisis de las heces de humanos y animales salvajes, hasta los criados en granjas domésticas e industriales, incluyendo también los productos alimenticios que se obtienen de algunos animales de granjas. De igual manera, se hacen estudios ambientales para observar residuos de tetraciclina en sedimentos y aguas subterráneas o superficiales (5, 8, 39, 40, 70).

Estos genes se han identificado en varias especies de bacterias Gram + y Gram -, de las cuales podemos mencionar *Pseudomonas* sp , *Enterococcus* sp., *Campylobacter* sp , *Shigella* sp , entre otras (59, 80, 84), las cuales juegan un papel importante en la diseminación de determinantes genéticos entre las mismas o diferentes especies (17)

En humanos con sintomatología, los estudios clínicos que se han realizado es utilizando heces, mientras en personas sin sintomatología, son pocos los estudios reportados Karami y col (2006) (39), detectó en heces de infantes de Suecia 37 muestras comensales de *E. coli* con *tet A* (49%) y *tet B* (51%) Estos resultados son importantes porque demuestran que estas bacterias adquieren resistencia por alguna ruta y actúan como reservorios, a pesar de que la tetraciclina no es administrada a infantes (52) De manera interesante, las muestras con resistencia con un largo tiempo de colonización, presentan una disminución de los genes, lo que sugiere que las bacterias tienen algún mecanismo que equilibra el costo de producción de los elementos (39)

En el caso de las muestras clínicas, se manifiestan los genes en pacientes con diarrea, problemas de infecciones abdominales, neumonía adquirida en la comunidad y hospitales, e incluso infecciones en la piel (80). En este estudio se analizaron 1 680 muestras de *E. coli*, los resultados obtenidos demostraron que el 15% corresponde a genes con resistencia a tetraciclina y susceptibles a minociclina, mientras que el 64% resistentes a minociclina Un total de 452 muestras fueron positivas por PCR para uno o varios genes de resistencia a tetraciclina Los genes *tet A* y *tet B* se presentan alrededor del mundo y los *tet C*, *tet D* y *tet E*, se encuentran con menos frecuencia. Una gran cantidad de muestras presentó combinaciones de genes, en especial el *tet E*, el cual se determinó más en combinación con *tet B*, que solo. En América Latina predomina el gen *tet B* (41%), el *tet A* solo se aisló en el 19.7%, el *tet C* en el 0.8% y el *tet D* en

el 2.5%, mientras que en el este de Europa y Asia Pacífico, predominan los genes *tet A* y *tet B*, y para sur de África y oeste de Europa, el *tet A*. Vergara y col (2007) (84), identificaron plásmidos en enterobacterias patógenas asociadas con resistencia a antibióticos, en muestras diarreicas de niños en Colombia, siendo determinadas todas las muestras de *E. coli* enteropatógena con plásmidos, mientras que en las de *Shigella* sp y *Salmonella* sp, hay presencia y ausencia de los mismos. Redondo y Alonso (2007) (64), demostraron por medio de ensayos de conjugación, la transferencia horizontal de genes en plásmidos conjugativos, 67% de las muestras mostraron un fenotipo de múltiple resistencia y a través del uso de enzimas de restricción, demostraron que existen cepas bacterianas aisladas en diferentes áreas del mismo hospital que portan plásmidos con idénticos patrones de restricción.

La presencia de plásmidos también se asocia a la resistencia en aguas crudas y tratadas, siendo las muestras tratadas, las que mayor prevalencia de plásmidos poseen y la resistencia a antibióticos se manifiesta en más de tres antimicrobianos, siendo la tetraciclina el segundo más resistente en aguas crudas, pero baja la incidencia en las aguas tratadas (91). De igual forma Nuñez y col. (2012) (54), reportaron que las muestras de aguas residuales presentan más resistencia a tetraciclina que las tomadas de líquidos residuales hospitalarios. Talukdar y col en el 2013 (78), analizaron 233 muestras de *E. coli*, provenientes de diferentes puntos donde el agua es distribuida a la población de Dhaka (Bangladesh), el 45% mostró *E. coli* con susceptibilidad antimicrobiana a la tetraciclina, en el estudio se asocia su resistencia a múltiples plásmidos conjugativos.

Santamaría y col (2011) (70), realizaron un estudio para la detección, diversidad y distribución de genes que codifican proteínas de protección ribosomal y bombas de eflujo en muestras de fluidos estomacales y heces de animales rumiantes, y muestras ambientales (suelo y agua), en los



sistemas de producción de ganado con pastizales en Colombia. Este sistema usa aproximadamente el 26% de la superficie de la tierra y los resultados confirmaron que estos lugares son una fuente de contaminación de antibióticos (70). La mayoría de los genes encontrados por PCR son los que codifican proteínas de protección ribosomal (*tet W*, *tet Q*, *tet B(P)* y *tet O*) (70). En algunos lugares de estudio se detectaron los genes en muestras de animales y en el ambiente, en otros casos solo se detectó en un solo tipo de muestra (70). Los genes *tet W* y *tet Q* fueron los que mayor incidencia mostraron en las muestras de agua. El gen *tet B* que codifica bombas de eflujo fue detectado en heces y su frecuencia fue muy baja (70). En el estudio se concluye que la resistencia en las bacterias en la naturaleza es el resultado de una presión selectiva (70). Esto se evidencia porque la microbiota presente en los fluidos estomacales difiere con la de las heces, y que las aguas y suelos de estos lugares son reservorio y fuentes de distribución para los genes que codifican resistencia a tetraciclina (70).

En el estudio de Alexander y col (2013), se muestra el efecto de los niveles terapéuticos y subterapéuticos que pueden tener los genes de resistencia de clortetraciclina (CT) o en combinación con oxitetraciclina en niveles terapéuticos (CT-OX). La mayoría de las muestras presentó la combinación de CT-OX ( $N=99$ ). El *tet A* se presentó en porcentajes similares para ambos tratamientos, el *tet B* obtuvo una baja prevalencia en aislamiento de CT pero no así en combinación de CT-OX, 18% y 34%, respectivamente. El *tet C*, mostró una alta frecuencia para ambos tratamientos (46% versus 28%,  $P<0.05$ ) (6).

Al-Bahry y col (2013) (5), utilizando PCR encontraron genes de resistencia a tetraciclina asociados a plásmidos en el colón de gallinas, la mayoría de los resultados fueron positivos (97,9%) para genes *tet A* y *tet B*. También, se determinó la combinación de ambos genes de eflujo. Para determinar residuos de tetraciclinas (oxitetraciclina, clortetraciclina y

doxyciclina) en la muestra, se usó una cromatografía líquida de alto rendimiento en conjunto con el análisis de masa a través de un espectrofotómetro cuádruplo (HPLC/MS/MS: *High performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry*, por sus siglas en inglés) (5). De igual manera Bryan y col (2004), realizaron 1 263 aislamientos en heces de animales y humanos, de los cuales 325 fueron altamente resistentes a tetraciclina ( $\geq 93 \mu\text{g/ml}$ ). Al aplicar la técnica de PCR múltiple a 325 aislamientos, confirmaron en el 97% de las muestras la presencia de por lo menos 1 de los 14 genes de resistencia a tetraciclina, siendo los genes *tet B* (63%) y *tet A* los más prevalentes, y también, se detectaron los genes *tet C* y *tet D*. En las muestras de cerdo y gallina se detectó por primera vez el gen *tet M* (codifica proteínas de protección ribosomal), el cual se detectó en conjunto con otros determinantes genéticos (14). En el estudio, 22.2% y 1.9% de las muestras contienen dos o tres genes de resistencia a tetraciclina, respectivamente (14). El estudio concluye que la frecuencia y distribución de genes *tet* en las poblaciones naturales de *E. coli* aisladas de las muestras de animales, puede ser provocada por la actividad humana, ya que su exposición continua a genes de resistencia favorece la transferencia de genes a causa de la selección natural (14).

En los estudios de Kaesbohrer (37) y col (2012) y Wasyl y col (2013) (87), se detectó que las aves de corral son las que mayor resistencia presentan a varios antibióticos, siendo la tetraciclina uno de los más prevalentes, en comparación con el ganado y cerdo. Las gallinas ponedoras y las aves de engorde, respectivamente, son las de mayor sensibilidad a las pruebas de concentración mínima de inhibición utilizadas en el estudio. Los animales no domésticos (silvestres), también están presentando genes de resistencia a tetraciclina, con un rango entre 19 a 35% en Portugal y se confirman con genes *tet A* y/o *tet B* en muestras de *E. coli* (20). Pantozzi y col (2010), en un estudio en

Argentina, reportaron que el patrón de resistencia más publicado en la literatura para *E coli* es ampicilina-estreptomicina-tetraciclina-cloranfenicol, y en este estudio, la mayor incidencia de tetraciclina se presentó en las muestras de cerdo y aves de cría intensiva, lo que sugiere que las muestras con esta bacteria pueden alcanzar patrones de multiresistencia (59) La mayoría de los estudios se han enfocado en el monitoreo de los animales de granja porque los mismos son tratados con antibióticos para su engorde y son considerados una fuente de reserva para genes con resistencia (20) Se conoce que cepas de *E coli* patógenas, pueden transferir resistencia a cepas comensales del intestino y estos animales criados en granjas terminan como alimento de muchas personas, razón por la cual, en el estudio de Frye y col (2013) para Estados Unidos (EEUU), se menciona que los genes más prevalentes son los *tet A*, *tet B*, *tet G* y *tet M* (28)

### **3. El uso de PCR en la detección de genes de tetraciclina**

Los plásmidos son utilizados comúnmente para clonar fragmentos de ADN obtenidos a partir de moléculas de tamaño y complejidad limitados, como los virus, y para subclonar fragmentos grandes de ADN previamente clonados en otros vectores (74)

Desde 1983, cuando Kary Mullis desarrolló la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), su utilidad ha ido en aumento porque no solo se puede usar para clonar ADN y amplificar un vector con fines de secuenciación, mutagénesis o subclonaje, sino también para la amplificación y detección de genes de resistencia Esta técnica ha permitido la amplificación de ADN mediante su replicación en un material biológico, lo que permite un ahorro en tiempo y en el desarrollo de metodologías complejas (74)

Las publicaciones actuales hacen uso de ésta técnica para caracterizar secuencias de genes específicos y realizar estudios de vigilancia

molecular ambiental y zoonótica, con la finalidad de disminuir el riesgo de la población mundial a la reemergencia de la resistencia bacteriana a antimicrobianos (1, 5, 20, 21, 28, 78)

### **3.1. PCR múltiple en la detección de genes de resistencia**

El uso de esta técnica ha permitido la búsqueda de varios genes en una misma muestra, lo que ha permitido una disminución en el tiempo de obtención de los resultados y abaratado los costos al compararlo con un análisis de PCR individual. En el estudio de Ng y col (2001) (53), indican que éste puede ser un método útil para diferenciar los tipos de genes de resistencia en la tetraciclina, cuando se usa en la investigación de brotes.

# ***OBJETIVOS***

## **OBJETIVO GENERAL**

- **Evaluar cuantitativamente la prevalencia de genes de resistencia a tetraciclina en ADN plasmídico de cepas de *E. coli* aisladas de muestras ambientales de aguas y de heces de animales (gallina, cerdo y vaca) y, humanos, colectadas en tres poblados de Panamá, con el fin de valorar la importancia que tiene la propagación de genes de resistencia entre las diferentes fuentes de muestreo**

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- **Determinar la presencia de ADN plasmídico en cepas de *E. coli* aisladas de muestras ambientales de aguas y de heces de animales (gallina, cerdo y vaca) y humanos, con el propósito de evaluar cualitativamente la prevalencia de genes de resistencia a tetraciclina en estas fuentes**
- **Desarrollar una técnica de PCR múltiple para la detección de los genes de resistencia a tetraciclina (*tet A* y *tet B*) en ADN plasmídico de cepas de *E. coli* aisladas de muestras ambientales de aguas y de heces de animales (gallina, cerdo y vaca) y humanos, con la finalidad de evidenciar la propagación de genes de resistencia entre las diferentes fuentes de muestreo**

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

### **1. Cultivos bacterianos**

Se analizaron 132 cepas de *E. coli* previamente aisladas de heces de humanos y animales (cerdos, vacas y pollos), y de aguas cercanas a las fuentes de muestreo, colectadas en tres diferentes áreas del país. Dos áreas de muestreo corresponden al corregimiento de El Arado y La Ciudad del Niño, ambos en el distrito de La Chorrera, Provincia de Panamá; otra área fue en el corregimiento de El Escobal, Distrito de Colón, Provincia de Colón. Las mismas reposan en el Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) de la Vice-Rectoría de Investigación y Post-Grado, Universidad de Panamá (90).

### **2. Extracción de ADN plasmídico**

El ADN plasmídico de las cepas de *E. coli* se extrajo por el método de extracción de lisis alcalina (69). Se tomaron 3 ml de muestras de *E. coli*, sembradas en caldo nutritivo, en microtubos estériles de 1.5 ml. El pellet extraído se resuspendió en 100 µL de la solución I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris a pH 8 y 10 mM de EDTA) por medio de un vortex y se dejó reposando por 5 min a temperatura ambiente (TA). Luego, se añadió 200 µL de la solución II (0.2 M de NaOH y 1% SDS), y se colocó en hielo por 5 min. Seguido, se añadió 150 µL de la solución III (ácido acético glacial) previamente enfriado, y se colocó en hielo por 5 min. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min.

Después, se transfirió el sobrenadante (aproximadamente 450 µL) a un microtubo limpio y se añadió 400 µL de cloroformo, evitando cualquier interfase. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min. Seguido, se transfirió la capa superior a un microtubo limpio y luego, se añadió el doble del volumen de isopropanol 100% frío y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min. Se removió el sobrenadante y se agregó 500 µL de etanol al 70% por las paredes del tubo. Se mezcló sin



resuspender por inversión y se retiró el etanol, secando con papel toalla el excedente y completamente a TA o con un secador manual. Por último, se resuspendió el pellet resultante con 50 µL de agua libre de nucleasa estéril. Luego, se añadió 1 µl de ARNasa y se incubó por 30 min a 37°C. Si no se utilizaba inmediatamente el ADN, se congelaba a -20°C.

### **3. Electroforesis para la detección de plásmidos en cepas de *E. coli***

Los productos de amplificación se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% que contenía 0.5X de TBE (10X TBE corresponde a 0.89 M Tris base, 0.89 M ácido bórico y 0.02 M EDTA sal disódica a pH 8.4) y 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La muestra para cada pocillo llevaba 2 µL de tampón de corrida (azul de bromofenol) y 10 µL de la muestra de ADN plasmídico. La misma se corrió durante 1 h a 120 voltios, después se observó el producto de amplificación en un transiluminador de luz ultravioleta (UV). En la mitad y en un extremo de cada gel, se añadió un marcador de peso molecular de 500 pb.

### **4. Estandarización de PCR múltiple para la detección de los genes *tet A* y *tet B*, resistentes a la Tetraciclina**

Se usó una combinación de pares de cebadores para detectar por medio de una PCR múltiple los genes *tet A* y *tet B* en cada muestra. Los cebadores se seleccionaron de acuerdo a su temperatura de hibridación y tamaño del amplicón, para los cuales se utilizó como referencia la metodología de Bailey y col, 2010 (12).

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl, el cual contiene 200 µM de cada dNTP, 1 µM de cada cebador, 2 µl de la muestra de ADN plasmídico y 1.25 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Se usó el termociclador (Life Touch, Bioer Technology CO LTD, China), con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94°C por 4 min,

seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 5 min (Cuadro 2).

Para determinar las cepas de control positivo en cada cebador, se aplicó cada cebador de manera individual en algunas muestras que resultaron positivas para plásmidos. Siendo en este caso la muestra de gallina (AGa5) de El Árado, positiva para *tet A*, y la muestra de gallina (CiGa2) de Ciudad del Niño, positiva para *tet B*.

Los productos amplificados se visualizaron mediante una electroforesis de gel de agarosa al 1,5%. En cada pocillo se utilizó 7 µL de ADN obtenido por PCR múltiple y 2 µL de de tampón de corrida (azul de bromofenol). En cada electroforesis se incluyó un control positivo para *tet A* y *tet B*, un control negativo (agua libre de nucleasas) y un marcador molecular de 100 pb para comparar con cada una de las muestras analizadas.

**Cuadro 2.** Cebadores usados en este estudio para la amplificación de los genes *tet A* y *tet B*. Se utilizó como referencia la metodología de Bailey y col., 2010 (12).

Nombre del cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón	Temperatura de anidación
<i>tet A-F</i>	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	210	55
<i>tet A-R</i>	CATAGATCGCCGTGAAGAGG		
<i>tet B-F</i>	TTGGTTAGGGGCAAGTTTGTG	659	55
<i>tet B-R</i>	GTAATGGGCCAATAACACCG		

seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 5 min (Cuadro 2).

Para determinar las cepas de control positivo en cada cebador, se aplicó cada cebador de manera individual en algunas muestras que resultaron positivas para plásmidos. Siendo en este caso la muestra de gallina (AGa5) de El Árado, positiva para *tet A*, y la muestra de gallina (CiGa2) de Ciudad del Niño, positiva para *tet B*.

Los productos amplificados se visualizaron mediante una electroforesis de gel de agarosa al 1,5%. En cada pocillo se utilizó 7 µL de ADN obtenido por PCR múltiple y 2 µL de de tampón de corrida (azul de bromofenol). En cada electroforesis se incluyó un control positivo para *tet A* y *tet B*, un control negativo (agua libre de nucleasas) y un marcador molecular de 100 pb para comparar con cada una de las muestras analizadas.

**Cuadro 2.** Cebadores usados en este estudio para la amplificación de los genes *tet A* y *tet B*. Se utilizó como referencia la metodología de Bailey y col., 2010 (12).

Nombre del cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón	Temperatura de anidación
<i>tet A</i> -F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	210	55
<i>tet A</i> -R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG		
<i>tet B</i> -F	TTGGTTAGGGGCAAGTTTGT	659	55
<i>tet B</i> -R	GTAATGGGCCAATAACACCG		

# ***RESULTADOS***

**Determinación de la presencia de plásmidos en muestras retrospectivas de *E. coli* pertenecientes a LAMEXA, Universidad de Panamá.**

Se analizaron 132 muestras en total, provenientes de tres comunidades, dos de la provincia de Panamá Oeste (El Árado y Ciudad del Niño) y una de la provincia de Colón (El Escobal) Para las tres localidades, la cantidad de muestras varió. Se analizaron 40 muestras en El Arado, 49 en Ciudad del Niño y 43 en El Escobal (Cuadro 3)

Se obtuvo como resultado que 67,4% (89 de 132) de las muestras analizadas, presentaron plásmidos En las muestras de Ciudad del Niño se determinó el 35,9% (32/89), en El Arado 31,5% (28/89) y en El Escobal con 32,5% (29/89), de muestras positivas (Figuras 3 y 4) (Cuadro 3)

Al evaluar los resultados, se pudo observar, que las muestras de heces de humanos en la comunidad Ciudad del Niño presentaron la mayor prevalencia de plásmidos con un 10,1% (9/89) (Figura 5) (Cuadro 4). En la comunidad de El Arado, las muestras de agua son las más prevalentes con 9% (8/89) En El Escobal, fueron las muestras de gallina, vaca y humano las más prevalentes, obteniéndose en cada una de estas fuentes un 7,9% (7/89).

**Cuadro 3.** Plásmidos y genes de resistencia (*tet A* y *tet B*) que se obtuvieron en las diferentes muestras de los sitios de colecta. Cada sitio ha sido dividido por colores.

LUGAR			PLÁSMIDO			GENES						RESISTENCIA/ SENSIBLE		
EL ARADO	CIUDAD DEL NIÑO	EL ESCOBAL				A	B	A	B	A	B			
AAg1	CiAg1		1	1		1	1	0	0			R	R	
AAg2	CiAg2	EAg2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	R	R	0
AAg3	CiAg3		1	1		1	0	0	0			R	R	
AAg4	CiAg4		1	0		1	1					R	R	
AAg5	CiAg5		1	0		0	0					R	R	
AAg6	CiAg6	EAg6	1	0	1	1	0			0	0	R	R	0
AAg7	CiAg7	EAg7	1	0	0	1	0					S	R	0
AAg8	CiAg8		0	1				1	0			S	R	
AAg9	CiAg9	EAg9	1	1	1	0	0	1	0	1	0	R	R	0
AAg10	CiAg10		0	1				0	0			R	R	
ACe1	CiCe1	ECe1	0	1	1			1	1	0	0	R	R	R
ACe2	CiCe2	ECe2	1	1	0	1	0	0	1			R	R	R
ACe3	CiCe3	ECe3	1	0	1	1	0			0	0	R	R	R
ACe4	CiCe4	ECe4	1	0	1	1	0			1	0	R	R	R
	CiCe5	ECe5		0	0								R	R
	CiCe6	ECe6		1	1			1	1	0	0		R	R
ACe7	CiCe7	ECe7	1	0	0	1	1					R	R	R
ACe8	CiCe8	ECe8	1	0	0	1	0					R	R	R
ACe9	CiCe9	ECe9	1	1	0	1	1	1	0			R	R	R
	CiCe10			1				0	0				R	
ACe11		ECe11	1		1	1	0			0	0			
AGa1	CiGa1	EGa1	1	0	0	1	0					R	R	0
AGa2	CiGa2	EGa2	0	1	1			0	0	1	0	R	R	0
	CiGa4	EGa4		1	1			1	0	1	1		R	R
AGa5	CiGa5	EGa5	1	0	1	1	0			0	0	R	R	R
	CiGa6	EGa6		1	1			1	0	1	1		R	R

\* 1= hace referencia a la presencia de plásmidos y genes de resistencia a tetraciclina, y 0= a la ausencia de plásmidos y genes en la muestra. Los datos del análisis de resistencia bacteriana y sensibilidad fueron facilitados por el Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (R= muestra con resistencia al antibiótico tetraciclina; S = muestra sensible al antibiótico; 0 = no hay resistencia) (90).



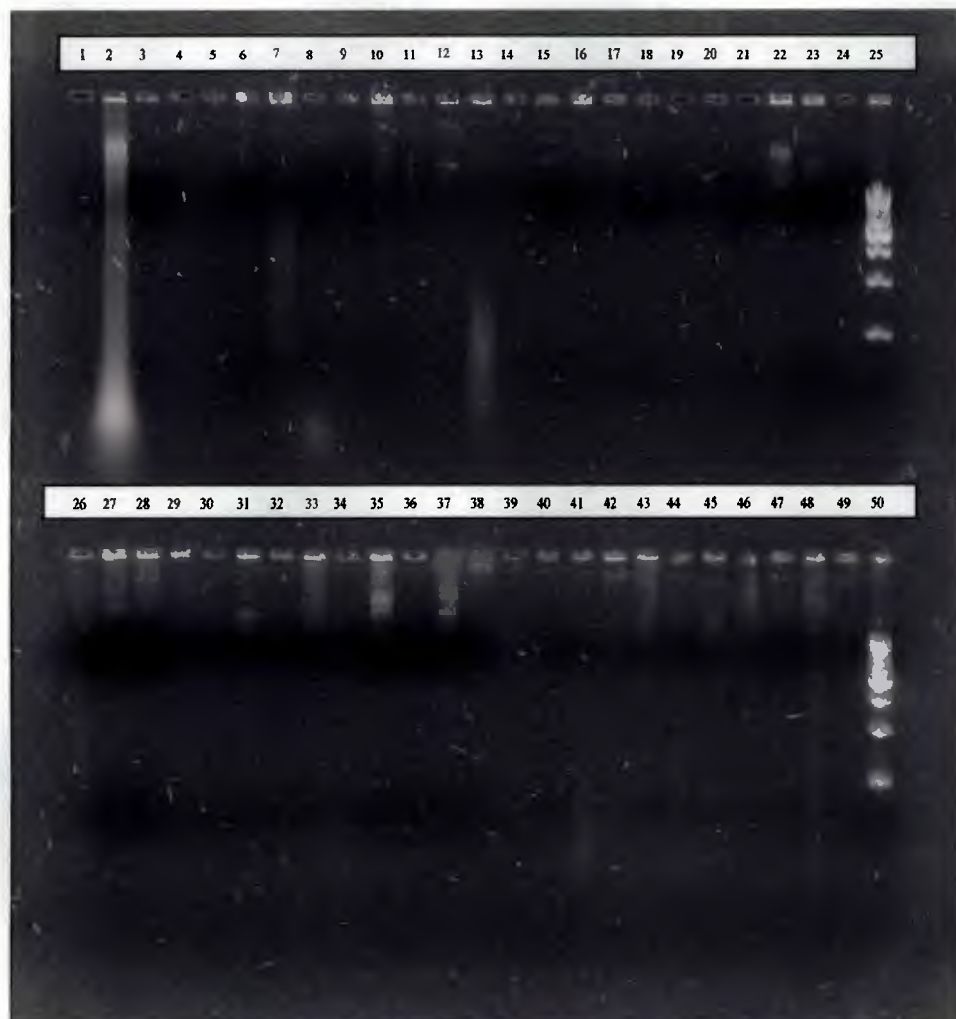
**Cuadro 3.** Plásmidos y genes de resistencia (*tet A* y *tet B*) que se obtuvieron en las diferentes muestras de los sitios de colecta. Cada sitio ha sido dividido por colores (continuación).

LUGAR			PLÁSMIDO			GENES						RESISTENCIA/ SENSIBLE		
EL ARADO	CIUDAD DEL NIÑO	EL ESCOBAL				A	B	A	B	A	B			
	CiGa7	EGa7		0	1					0	0		R	R
AGa8	CiGa8	EGa8	1	1	1	1	0	1	1	1	0	R	R	R
AGa9	CiGa9	EGa9	0	1	1			0	1	0	0	S	R	0
AGa10	CiGa10	EGa10	1	0	0	1	0					R	R	0
AGa11			0											
AGa12			1			1	1							
AHu1A	CiHu1	EHu1	0	1	1			1	0	0	0	S	0	R
AHu2A	CiHu2	EHu2	1	1	1	1	0	0	0	1	0	S	0	R
AHu3A	CiHu3	EHu3	1	1	1	0	0	1	0	1	1	S	0	0
AHu4	CiHu4	EHu4	0	1	1			1	0	1	0	S	0	0
AHu5	CiHu5	EHu5	0	1	1			0	0	0	0	R	0	0
AHu6	CiHu6	EHu6	0	1	1			0	0	1	0	S	R	R
	CiHu7	EHu7		0	0								R	0
	CiHu8	EHu8		1	1			0	1	0	0		R	0
	CiHu9	EHu9		1	0			1	1				R	0
	CiHu10	EHu10		1	0			1	0				0	R
	CiVa1	EVa1		1	0			1	1				R	R
AVa2	CiVa2	EVa2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	R	R	R
AVa3	CiVa3	EVa3	0	0	1					1	0	R	R	R
	CiVa4	EVa4		1	1			1	0	0	0		0	0
AVa5	CiVa5	EVa5	0	0	1					1	0	S	R	0
AVa6	CiVa6	EVa6	1	1	1	0	0	1	0	1	0	R	R	0
AVa7	CiVa7	EVa7	1	1	1	0	0	1	1			S	0	0
AVa8	CiVa8	EVa8	1	1	1	0	0	0	0	1	1	S	0	0
	CiVa9	EVa9		0	0								0	0
AVa10	CiVa10		1	1		0	0	1	0			S	0	
AVa11		EVa11	1		0	0	0							

\* 1= hace referencia a la presencia de plásmidos y genes de resistencia a tetraciclina, y 0= a la ausencia de plásmidos y genes en la muestra. Los datos del análisis de resistencia bacteriana y sensibilidad fueron facilitados por el Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (R= muestra con resistencia al antibiótico tetraciclina; S = muestra sensible al antibiótico; 0 = no hay resistencia) (90).

**Cuadro 4.** Cantidad de plásmidos obtenidos en las tres comunidades de acuerdo a la fuente de muestreo.

<div style="display: inline-block; transform: rotate(-45deg);"> Fuerza → ↓ Lugar </div>	Agua	Cerdo	Gallina	Humano	Vaca
Ciudad del Niño	6	5	5	9	7
El Arado	8	7	5	2	6
El Escobal	3	5	7	7	7
Total	17	17	17	18	20



**Figura 3.** Gel de agarosa al 1,5% que muestra los resultados de la electroforesis realizada después de la extracción de ADN plasmídico en los aislamientos de *E. coli* procedentes de las diferentes fuentes de muestreo de este estudio.



**Cuadro 4.** Cantidad de plásmidos obtenidos en las tres comunidades de acuerdo a la fuente de muestreo.

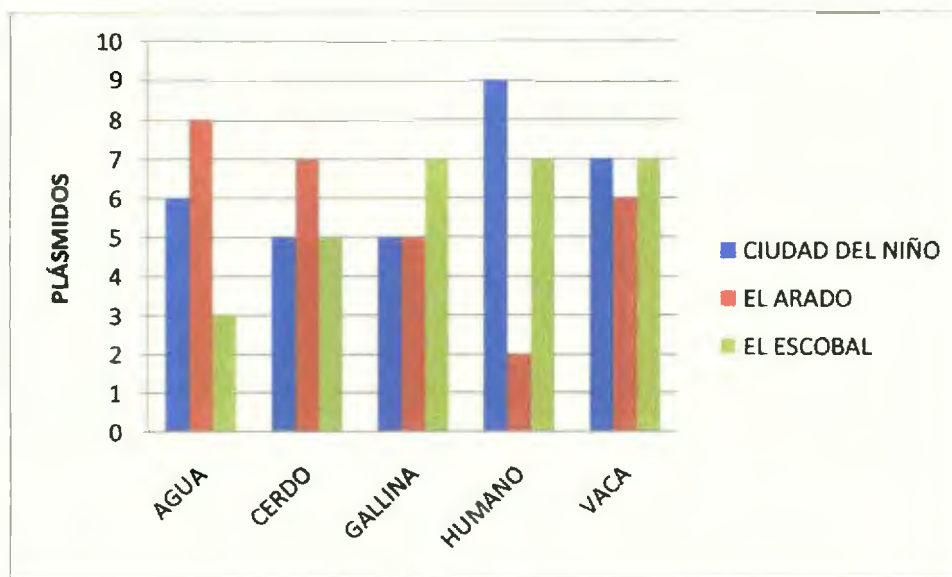
<div style="display: inline-block; transform: rotate(-45deg);"> Fuerce → ↓ Lugar </div>	Agua	Cerdo	Gallina	Humano	Vaca
Ciudad del Niño	6	5	5	9	7
El Arado	8	7	5	2	6
El Escobal	3	5	7	7	7
Total	17	17	17	18	20



**Figura 3.** Gel de agarosa al 1,5% que muestra los resultados de la electroforesis realizada después de la extracción de ADN plasmídico en los aislamientos de *E. coli* procedentes de las diferentes fuentes de muestreo de este estudio.



**Figura 4.** Porcentaje de prevalencia de plásmidos obtenidos en cada uno de los sitios de colecta.



**Figura 5.** Prevalencia de plásmidos en las diferentes fuentes de muestreo colectadas en las tres localidades del estudio.

**Detección de genes de resistencia *tet A* y *tet B* al antibiótico tetraciclina en muestras de ADN plasmídico de *E. coli* por la técnica de PCR múltiple.**

En este trabajo se ha estandarizado una técnica de PCR múltiple para detectar dos genes de resistencia a la tetraciclina en aislamientos de ADN plasmídico de *E. coli* procedentes de heces de algunos animales (cerdo, gallina y vaca) y humanos, y aguas, de cada uno de los sitios de colecta de este estudio

La PCR múltiple que se ha logrado estandarizar para Panamá, se ha evaluado de forma cuantitativa mediante el tamaño de las bandas de los cebadores que aparecen en la metodología de Bailey y col (2010) (12) (Cuadro 2) Primero los cebadores se utilizaron individualmente en los aislamientos de *E. coli* de muestras retrospectivas que se encontraban en LAMEXA, donde se obtuvo el patrón de bandas deseadas en las muestras AGa5 (muestra de gallina en El Árado) y C1Ce2 (muestra de cerdo en Ciudad del Niño), y estas fueron utilizadas posteriormente como controles positivos para *tet A* y *tet B*, respectivamente, para toda la investigación. Luego, con las cantidades adecuadas de reactivos y cebadores, se estandarizó la PCR múltiple con las características deseadas. Como referencia para el patrón de bandas esperada se utilizó un marcador molecular de 100 pb (Figura 6)

De las 89 muestras positivas de ADN plasmídico analizadas, se obtuvo un 59,6% (53/89) de muestras con los genes *tet A* y/o *tet B*. El total de genes que se identificaron en estas 53 muestras fueron 73 (Cuadro 3). Al analizar la prevalencia de estos genes de resistencia entre las tres comunidades, se observó que el gen de resistencia que tiene la mayor prevalencia es el *tet A* con 72,6% (53/73) resultados positivos. En el caso del gen *tet B*, se obtuvo en 27,4% (20/73) resultados positivos (Cuadros 3 y 5)

Se determinó que el 27,4% (20/73) de las muestras presentaron ambos genes de resistencia (*tet A* y *tet B*) El 49,3% (36/73) y el 4,1% (3/73) de las muestras, presentaron los genes *tet A* y *tet B* como único gen, respectivamente Las muestras con solo el gen *tet B*, se registraron en la comunidad de Ciudad del Niño y proceden de una muestra de cerdo, una de gallina y una de humano (Cuadros 3 y 5) En las muestras de ADN plasmídico donde el gen *tet A* aparece como único gen, la mayor prevalencia, con 6,8% (5/73) se obtuvo de muestras de cerdo que procedían de la comunidad de El Árado

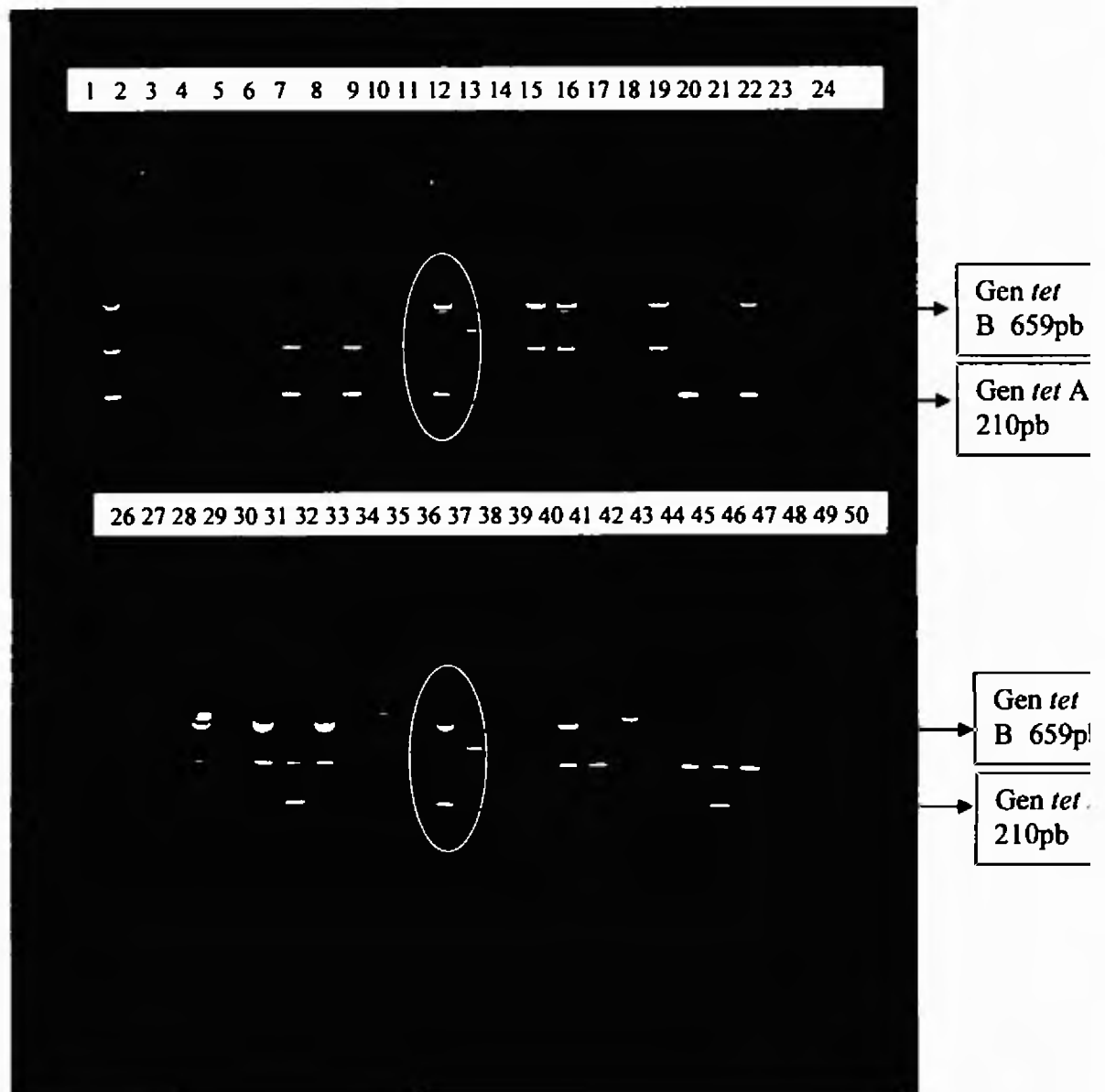
En la Ciudad del Niño se encontró la mayor prevalencia de genes de resistencia a tetraciclina, detectándose en 38,4 % (28/73) de las muestras, en la comunidad de El Árado en 37,0% (27/73) de las muestras y en El Escobal, en 24,7% (18/73) de las muestras

Evaluando los genes por sitio de colecta se observó que en El Árado, las muestras de cerdo presentaron la mayor prevalencia de genes de resistencia con el 9,6% (7/73). En la Ciudad del Niño, las muestras de humano y vaca son las de mayor prevalencia, ambas con 6,5% (5/73) En la comunidad de El Escobal, se determinó el 5,5% (4/73) en muestras de gallina, humano y vaca (Figura 7) (Cuadro 5)

Al analizar los genes de resistencia por fuente de colecta, se determinó que las muestras de gallina tienen el 23,3% (17/73) de los genes de resistencia, las de cerdo el 22,0% (16/73), las de vaca el 19,2% (14/73), y por último, con 17,8% (13/73) las de agua y humano para ambos tipos de muestras

Para el gen *tet A*, se obtuvo el 16,4% (12/73) en muestras de gallina, el 15,1% (11/73) en muestras de cerdo y 13,7% (10/73) en muestras de agua, hombre y vaca, siendo este gen el de mayor prevalencia El gen *tet B*, se registró con mayor prevalencia en muestras de cerdo y gallina, con el 6,9% (5/73) para ambas fuentes, el 5,5% (4/73) en las de vaca y 4,1% (3/73) en las de humano y agua. Las muestras de gallina y vaca de los

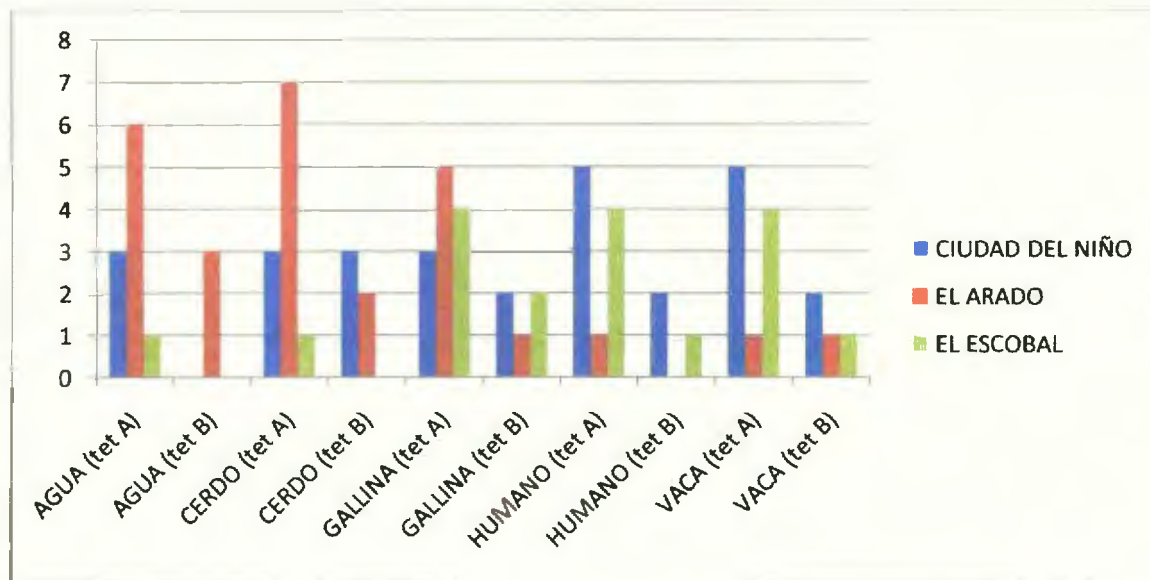
tres lugares, son las únicas que presentaron ambos genes de resistencia en el estudio (Figura 7)



**Figura 6** Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5% después de realizar la PCR múltiple para confirmar la presencia o ausencia de los genes de resistencia *tet A* y *tet B*. Las bandas resaltadas en el círculo rojo y con flechas son los controles positivos.

**Cuadro 5.** Genes de resistencia a tetraciclina que se detectaron en las tres comunidades del estudio mediante la técnica de PCR múltiple.

Lugar → ↓ Fuente		Ciudad del Niño	El Arado	El Escobal	Total
Agua	tet A	3	6	1	10
	tet B	0	3	0	3
Cerdo	tet A	3	7	1	11
	tet B	3	2	0	5
Gallina	tet A	3	5	4	12
	tet B	2	1	2	5
Humano	tet A	5	1	4	10
	tet B	2	0	1	3
Vaca	tet A	5	1	4	10
	tet B	2	1	1	4
Total		28	27	18	73



**Figura 7.** Prevalencia de los genes de resistencia *tet A* y *tet B* en las diferentes fuentes de muestreo colectadas en las tres localidades estudiadas.

**Resistencia y genes de resistencia (*tet A* y *tet B*) para el antibiótico tetraciclina presente en muestras de *E. coli* aisladas en diferentes fuentes de muestreo.**

Los resultados que se observaron para la resistencia, susceptibilidad y ausencia en las muestras, al administrarse el antibiótico tetraciclina, fueron facilitados por LAMEXA (Cuadro 3)

En este estudio, se obtuvo que el 62,9% (83 de 132) de las muestras analizadas expresaron resistencia al antibiótico tetraciclina. La comunidad con el número más alto se dio en la Ciudad del Niño con 45,8% (38/83), seguido de El Árado con 28,9% (24/83) y por último, El Escobal con 25,3% (21/83)

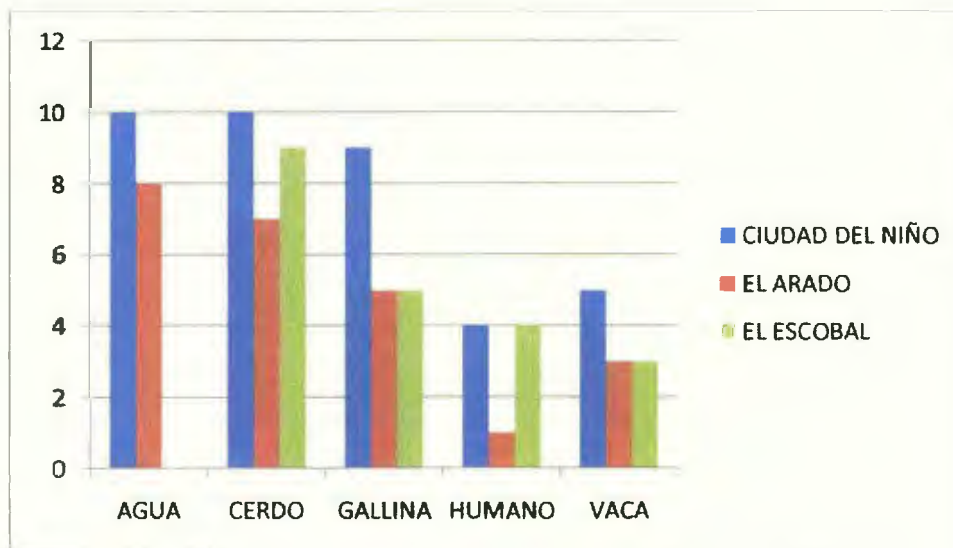
Las muestras de cerdo con 31,3% (26/83), gallina con 22,9% (19/83) y agua con 21,7 (18/83), fueron las muestras que presentaron una alta tasa de resistencia en las tres comunidades analizadas, a excepción de las muestras de agua en El Escobal, ninguna cepa salió resistente. En El Árado, se determinó que doce muestras (agua, gallina, humano y vaca) son susceptibles a este antibiótico (Figura 8) (Cuadro 3)

Se obtuvo 51 genes de resistencia en las 83 muestras que presentaron resistencia a este antibiótico, representando el 61,4% de las muestras analizadas. En El Árado se determinó que el 43,1% (22/51) de las muestras con resistencia presentaron genes de resistencia *tet A* y/o *tet B*, siendo esta comunidad la de mayor prevalencia. Un alto valor de genes también se obtuvo en la Ciudad del Niño con 39,2% (20/51) de las muestras y en El Escobal solo el 17,6% (9/51) de las muestras analizadas (Cuadro 6)

La mayor cantidad de genes *tet A* se obtuvo en El Árado con 31,4% (16/51) y para el gen *tet B* fue en la Ciudad del Niño con 15,7% (8/51)

**Cuadro 6.** Comparación de los valores de genes de resistencia por lugar obtenidos al aplicar la PCR múltiple.

<b>Lugar</b> <b>Genes</b>	<b>Ciudad del Niño</b>	<b>El Arado</b>	<b>El Escobal</b>
<b>tet A</b>	12	16	7
<b>tet B</b>	8	6	2
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>9</b>



**Figura 8.** Cantidad de muestras resistentes a la tetraciclina por fuente de muestreo y sitio de colecta.



# ***DISCUSIÓN***

**Determinación de la presencia de plásmidos en las muestras retrospectivas de *E. coli* pertenecientes a LAMEXA, Universidad de Panamá.**

El uso de los antibióticos sin ningún control de las proporciones y tiempo de exposición, para evitar la diseminación de agentes patógenos y promover el crecimiento de los animales de granja en comunidades rurales, es una estrategia que afecta negativamente a las personas y al ambiente en que estos se encuentran (22, 87) La principal afectación que se puede presentar en los animales, es que las bacterias de su flora intestinal van adquiriendo con el tiempo resistencia a los antibióticos que se les han suministrado (5, 32, 37, 52, 87) Hoy día hay planes de vigilancia mundial y campañas para concientizar a las personas sobre los daños que puede provocar el uso inadecuado de los antibióticos (57)

En condiciones ambientales normales, la interacción simbiótica entre las comunidades bacterianas y su hospedero, es el resultado de una larga co-evolución mutualista donde se benefician ambos (13, 43, 45) Entre los beneficios que adquiere el huésped, se puede mencionar, la ayuda que brindan las bacterias en funciones metabólicas, tales como degradación de nutrientes, y desarrollo de respuestas inmunes contra patógenos (3, 13, 43, 45, 72).

Los animales que crecen cerca del contacto humano tienden a presentar un incremento de bacterias resistentes que forman parte de su flora intestinal debido al uso inadecuado de antibióticos como resultado de la actividad humana (41, 47) Este incremento puede llevar también al hombre y a las masas de agua cercanas, a la adquisición de resistencia antimicrobiana (41). Esto es debido a que las bacterias en un ambiente con antibióticos tienden a sufrir mutaciones que las ayudan a continuar replicándose dentro del huésped, utilizan como mecanismo estratégico la transferencia de genes de resistencia en plásmidos conjugativos,

desplazando así a las bacterias sensibles y expresando la nueva carga genética de patogenicidad (2, 13, 52, 86)

Se ha documentado bien la presencia de plásmidos en Enterobacterias, como *E coli*, donde se concluye que los mismos tienen una rápida y efectiva tasa de transferencia (42), que juegan un rol muy importante en la sobrevivencia de las bacterias en el ambiente en que se encuentran y estos han existido desde mucho antes de la era de los antibióticos (16, 25, 44, 61) Los plásmidos siempre han estado dentro de la bacteria y en este estudio, a pesar de que las muestras ya tenían cerca de cinco (5) años de haber sido colectadas (retrospectivas), mantienen una alta prevalencia de los mismos, similar a lo presentado por otros estudios (4, 5, 16, 72) Estudios como el de Karami y col (2006) (39), describen que entre mayor sea el tiempo de colonización de la bacteria, se presenta una disminución en los factores de resistencia, lo que sugiere que las bacterias tienen algún mecanismo que equilibra el costo de producción de estos elementos En otros casos, se describe que, como respuesta a determinadas condiciones del medio ambiente, se produce un alza en los factores genéticos que se encontraban reprimidos o con bajos niveles de expresión (13).

Los plásmidos han mostrado una alta prevalencia en todas las fuentes de diseminación estudiadas de las tres comunidades, lo que sugiere que los hospederos mamíferos han estado expuestos a periodos largos de uso inadecuado del antimicrobiano (4, 90).

Las muestras de humanos de Ciudad del Niño tienen la mayor prevalencia de plásmidos en heces de humanos debido a la alta y prolongada exposición que presenta la comunidad a un ambiente con poca sanitización, donde predominan bacterias entéricas que sirven como reservorios de plásmidos La adquisición del plásmidos se pudo dar a través de la ingesta de alimentos provenientes de animales de crianza o

por la cercanía de las fuentes de agua a granjas donde se crían animales (4, 15, 16, 44, 68, 71)

La prevalencia de plásmidos en las muestras de vaca para las tres comunidades se piensa que debido al sistema de crianza intensivo y a los estrictos controles veterinarios para el cuidado y engorde de los animales de granja, son los más vulnerables a adquirir estos elementos móviles en su alimentación o control de enfermedades (89) Estos resultados guardan relación con los trabajos de Akingbade y sus colaboradores (2014) (4) al observar la multiresistencia de bacterias entéricas asociadas a infecciones del tracto urinario y Schuurmans, junto a sus colaboradores (2014) (73), al medir el efecto de tasa de crecimiento y presión selectiva en la tasa de transferencia de plásmidos.

Es importante destacar que una de las principales causas de contaminación en el ambiente es por las excretas del hombre y animales que llevan consigo bacterias con plásmidos conjugativos con resistencia a antibióticos, o por efectos de la industria hospitalaria o sintética de antibióticos, que desechan sus aguas servidas en las masas de agua que abastecen estos lugares y dichas aguas, no son tratadas antes de su consumo (15, 44, 70).

#### **Detección de los genes de resistencia *tet A* y *tet B* a la tetraciclina en muestras de ADN plasmídico de *E. coli* por la técnica de PCR múltiple.**

Las comunidades de bacterias dentro de un hospedero están sujetas a los cambios que este puede sufrir por las actuales tendencias que buscan aumentar la eficacia de los antibióticos tanto en medicina como en la agricultura (13, 25) Estos cambios en la relación huésped-patógeno tienden a que la bacteria sufra una presión selectiva y posterior adaptación genética en el ambiente que se encuentra, logrando así, nuevos y continuos cambios en sus funciones celulares, que dan como

resultado mecanismos de resistencia que permiten la sobrevivencia de la bacteria dentro del huésped (13, 16, 40)

En muchos artículos se hace referencia a que los mecanismos de resistencia bacteriana implican la transferencia de genes de resistencia a través de plásmidos conjugativos que facilitan su diseminación (15, 33, 44, 92) En este estudio, los resultados demuestran la alta prevalencia de genes de resistencia a tetraciclina que hay en los plásmidos de *E. coli*. Esta bacteria es muy utilizada para evaluar la calidad higiénica de los productos alimenticios y la diseminación de la resistencia antimicrobiana, ya que hay una alta prevalencia de genes de resistencia a tetraciclina en ella (6, 40).

En este sentido, los resultados demuestran una alta prevalencia de genes de resistencia a tetraciclina, siendo el gen *tet A*, el más prevalente. Estos resultados coinciden con los reportes realizados por Al-Bahry y col. en pollo (2013) (5), Alexander y col. (2013) (6) en ganado aplicando niveles terapéuticos y subterapéuticos de este antibiótico, y Koo junto a Woo (2011) (40) en carne y productos cárnicos.

En estudios recientes, se manifiesta que se ha incrementado la frecuencia del gen de resistencia *tet A*, seguido del gen *tet B* en los animales de granja, encontrándose mayormente de manera individual pero en algunas ocasiones, se puede encontrar este gen combinado con el *tet B* o con otros que se encuentran en menor porcentaje (*tet C*, *tet D* y *tet E*) pero se desconoce si la combinación de genes le favorezca a la bacteria aumentando su mecanismo de resistencia y patogenicidad dentro del organismo (2, 6, 15, 25, 40).

Las muestras de cerdo, agua y gallina son las que presentan mayor prevalencia de genes en El Árado, en La Ciudad del Niño son las de heces de humanos y vacas, y en El Escobal las de gallina, humanos y vaca. Siendo las de gallina las que mantienen valores muy altos de genes de resistencia en las tres comunidades, seguido de las heces de cerdo. A

pesar de que el porcentaje de resistencia más alto se obtuvo en Ciudad del Niño, el porcentaje del gen de resistencia *tet A* fue más alto para El Árado en muestras de agua y cerdo. La poca sanitización y la cercanía de la fuente de agua en esta comunidad, favorece a la alta prevalencia de genes de resistencia (90)

Los resultados para muestras de heces de pollo concuerdan con los de Al-Bahry (2013) (5), en donde se plantea que las condiciones ambientales a causa de la presión selectiva influyen en la adquisición y propagación de bacterias con genes de resistencia. Además, los resultados en todo el estudio, son parecidos a los resultados en los estudios de Momtaz y col en carne de pollo (2012) (50), Adesoji y col (2015) (2) en colectas realizadas en los sistemas de distribución de agua, Kanwar y col. (2013) (38) en heces de ganado para engorde, Núñez y col (2012) (54), quienes compararon muestras de aguas residuales en comunidades con las de los líquidos residuales hospitalarios, y Liu y col. (2015) (46) con animales de crianza y la carne para el consumo humano

Es importante resaltar que las muestras de heces de humano no manifiestan mucha resistencia al antibiótico (90) pero al hacer el análisis de prevalencia de genes de resistencia *tet A* y *tet B*, estas fuentes de muestreo presentan un alto porcentaje de genes, en especial el *tet A*, lo que nos está indicando que las personas al estar constantemente expuestas al antibiótico sirven también como reservorio de genes de resistencia, lo que puede favorecer al desarrollo de bacterias patógenas (71)

Los resultados de este estudio no coinciden con los trabajos de Karami y col (2006) (39), Tuckman y col (2007) (80), Wilkerson y col (2004) (88) porque el gen *tet B* es el de mayor prevalencia. Es importante resaltar que en estos trabajos, las muestras son clínicas y guardan relación con alguna infección causada por *E. coli*. En esta investigación, las muestras son ambientales y de heces de animales y humanos. En la literatura

revisada no se encontró si el aislar genes de resistencia de muestras clínicas y ambientales, tiene alguna diferencia en la prevalencia de genes *tet A* y *tet B*.

Los manejos intensivos actuales de los animales de granjas son susceptibles a desbalances bacterianos entéricos que llevan a una insuficiente conversión de los alimentos y a una disminución en la respuesta zootécnica (3). Las muestras provenientes de animales de granja como las de cerdo, vaca y pollo, son las que presentan una constante presencia y en algunas de estas, los más altos valores de genes de resistencia de *tet A* (5, 6, 40), como los encontrados en este estudio. Esto sugiere que los habitantes del lugar pueden estar suministrando antibióticos a la dieta diaria de estos animales para disminuir los trastornos diarreicos y ser efectivos en la promoción del crecimiento del animal (3, 6, 38). El consumo posterior de la carne de estos animales, puede ser una causa de la alta incidencia de genes de resistencia en las heces de humanos de las tres comunidades analizadas. La carne avícola, porcina y el ambiente agrícola donde se desarrolla el animal, pueden ser fuentes de bacterias resistentes a antibióticos, lo que podría transmitirse por medio de la industria de productos cárnicos (9, 40, 46, 50).

La alta prevalencia de genes de resistencia varía muy poco entre las diferentes fuentes de muestreo, por lo que es importante para futuros estudios en estas áreas, considerar que se debe contar con la misma cantidad de muestras para hacer una evaluación más exacta de los resultados obtenidos. En este estudio, la cantidad de muestras que no se encontraron para ser trabajadas fueron 22, una muestra corresponde a Ciudad del Niño, trece para El Árado y ocho para El Escobal. A pesar de contar estas dos últimas comunidades con menos muestras, se mantiene una alta prevalencia del gen *tet A* en algunas fuentes de muestreo, lo que sugiere que en estos lugares hay factores que causan una alta

propagación de genes de resistencia entre animales de crianza, humanos y el río donde conviven todos.

Al comparar estos resultados con otros estudios (15, 35, 46, 76, 89), se puede mencionar que los principales factores que pueden estar aumentando la propagación de estos genes de resistencia, son la administración de antibióticos no regulada y supervisada por las entidades de salud animal del país y la descarga no contralada de las heces de los animales de crianza en las aguas donde viven. En menor grado de contaminación, le sigue la descarga de aguas residuales en los ríos por parte de los mismos habitantes y de la industria presente en el lugar, ya que los ríos y suelos son reservorios y fuentes de distribución para los genes que codifican resistencia a tetraciclina (70). También, influye el consumo de carne y sus derivados con presencia de genes de resistencia, lo que trae como consecuencia, la alteración de las bacterias intestinales del organismo hospedero, esta exposición constante a genes de resistencia, influye en la alta transferencia de genes producto de la presión selectiva (14, 40, 70).

La alta prevalencia y diseminación de los genes de resistencia en el ambiente, son producto de la actividad humana, donde estudios como el de Kozak y col. (2009) (41), sugieren que entre más cerca está el animal de la actividad humana, más alta es la presencia de genes de resistencia y la capacidad antimicrobiana, en comparación con los animales que habitan zonas donde hay poca o casi nula la actividad humana, como la agricultura. Es importante resaltar el papel que están desempeñando factores de dispersión de genes que recientemente se han estudiado, entre estos tenemos el estudio de Usui y col. (2015) (81), en el mismo se determinó cómo pueden influir las moscas en granjas de cerdo y ganado sobre la propagación de factores de resistencia. De igual manera, el estudio de Jackson y col. (2015) (33), concluye que los animales usados como mascotas juegan un rol muy importante en la diseminación de



genes de resistencia a antimicrobianos, particularmente en humanos hospederos durante el tiempo de contacto entre ellos

**Resistencia y genes de resistencia (*tet A* y *tet B*) a la tetraciclina presente en las muestras de *E. coli* aisladas en las diferentes fuentes de muestreo.**

Estas muestras se pusieron a crecer en el 2010 con varios antibióticos en el laboratorio para observar su capacidad de sensibilidad y resistencia a los mismos (90). La alta presencia de resistencia antimicrobiana en las muestras ligada a una alta prevalencia de genes de resistencia a tetraciclina, demuestra que el ambiente donde se tomaron las muestras está contaminado con antibióticos (63) y que hay distribución de genes que codifican para su resistencia en la *E. coli* (7, 15, 44). Esto se confirma porque a pesar de que hay variación en la cantidad de genes de resistencia, hay presencia de ambos genes en todos los sitios de colecta y en casi todas las fuentes de muestreo (92, 93).

En La Ciudad del Niño se encontró la mayor cantidad de muestras con resistencia al antibiótico tetraciclina, la alta prevalencia puede darse porque esta comunidad es una asociación dedicada a la producción agropecuaria de autogestión (89), siendo las muestras de cerdo, agua y gallinas las más relevantes, y de igual forma se observa la misma tendencia en las otras dos comunidades a excepción de la toma de agua de El Escobal. Esto concuerda con los trabajos de Sun y Wu (2012) (76), quienes trabajaron con productos cárnicos y animales de crianza, Sayah y col. (2015) (71), ellos basaron sus resultados en el estudio de heces de animales domésticos y de granja, tanque séptico y agua superficiales, y Zhang y col. (2015) (91), trabajaron a nivel de la resistencia y eficacia de la desinfección en lugares donde se procesa alimentos. Un estudio que se desarrolló en colón de pollo con Al-Bahry y col. (2013) (5), manifiesta un

alto contenido de residuos de tetraciclina en el hígado y el riñón del animal, asociado a la multiresistencia presente en el animal

Para los altos valores de resistencia se puede pensar que en las muestras de cerdo y gallina, el sistema de producción ligado a la práctica intensiva, sobre todo en la Ciudad del Niño, mantienen una exposición constante a este antibiótico para el control de enfermedades y el engorde de los animales. En el estudio de van der Horst y col (2013) (83) se sugiere que la exposición a bajos niveles de antibióticos puede causar un aumento en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las bacterias, lo que aumenta más su resistencia, teniendo como consecuencia la aplicación de tratamientos con antibióticos más prolongados o aumento de la dosis del antibiótico. En el caso de las muestras de agua, como consecuencia de la actividad humana, las fuentes de agua de estos lugares sirven para la descarga de desechos de gallinas, vacas y cerdos, sin darse cuenta los miembros de la comunidad que estos lugares son reservorios de bacterias entéricas resistentes a tetraciclina porque codifican para bombas de eflujo y además, contribuyen a su dispersión (80, 93). Esto guarda relación con lo manifestado por Xi y col (2015) (89) al concluir que las heces de ganado contaminan los ríos. Si estas aguas llegan a los sistemas de distribución de agua, se puede diseminar fácilmente la carga genética resistente a antibióticos a través de su introducción a la cadena alimentaria mediante la acuicultura, agricultura y el lavado de los alimentos (2). Auerbach y col (2007) (10), mencionan que la desinfección con luz ultravioleta utilizada en las plantas de tratamiento de aguas residuales no causa una considerable disminución de genes de resistencia.

En futuros estudios es importante incluir muestras de suelo, ya que hay estudios que confirman la presencia de genes de resistencia antimicrobiana en estos ambientes (13). Además, considerar la evaluación de residuos de antibióticos en los animales y muestras de

agua, y la evaluación del tracto gastrointestinal en las muestras, a fin de entender mejor la relación ecológica de la bacteria con el ambiente en que se encuentra y la interacción que pueden tener los genes de resistencia en el hospedero, y así de esta manera, contribuir al desarrollo de estrictas regulaciones para el control del uso de antibióticos y evitar la aparición de cepas resistentes en el ambiente. Sin una conciencia y educación pública adecuada, y una acción urgente, hay una fuerte amenaza de retroceder a los años donde no había tratamiento eficaz para el control de las enfermedades infecciosas, lo que puede aumentar la mortandad de personas y animales a causa de bacterias resistentes (5, 61). Otra consecuencia, es el daño colateral que produce el antibiótico en las bacterias comensales del huésped, se produce alteración de la flora bacteriana que puede durar varios años, provocando que otras bacterias adquieran susceptibilidad al antimicrobiano administrado, haciendo al huésped más vulnerable a infecciones (4, 34, 45, 68, 75). Además, las bacterias con resistencia pueden durar mucho tiempo dentro del huésped humano aún en ausencia de la presión selectiva (34).

Está confirmado en esta evaluación cuantitativa realizada para este estudio, que la resistencia antimicrobiana está influenciada por la actividad antropogénica en los lugares de muestreo, y que puede tener consecuencias negativas en la salud pública y ambiental. Además, se ha demostrado que la técnica de PCR múltiple es una herramienta molecular que proporciona una manera rápida y eficaz para detectar genes de resistencia en plásmidos dentro de un ecosistema.

# ***CONCLUSIONES***

1. De las 132 cepas de *E. coli* analizadas, 89 fueron positivas para ADN plasmídico, con 67,4%. La comunidad de la Ciudad del Niño fue la de mayor prevalencia de plásmidos, con 35,9%, seguido de El Escobal con 32,5% y por último, El Árado con 31,5%
- 2 Las *E. coli* provenientes de las muestras de heces de humanos de la Ciudad del Niño, con un 10,1%, fueron las que presentaron la mayor prevalencia de plásmidos. En la comunidad de El Árado, las *E. coli* provenientes de las muestras de agua son las más prevalentes de plásmidos, con 9%. En El Escobal, fueron *E. coli* provenientes de las muestras de gallina, vaca y humano, obteniéndose en cada una de estas fuentes de colecta con un 7,9% de plásmidos
- 3 En las cepas con ADN plasmídico, el gen de mayor prevalencia fue el gen *tet A*, con 72,6% de muestras positivas. En el caso del gen *tet B*, se obtuvo resultados positivos en 27,4% de las muestras analizadas
4. Las muestras provenientes de agua y cerdo en el Árado son las que mantienen un alto valor del gen *tet A*. Las muestras de gallina se encuentran en las tres comunidades con una alta prevalencia de este gen.
- 5 Ochenta y tres (83) cepas de *E. coli* expresaron resistencia a la tetraciclina, lo que representa un 62,9% de muestras positivas. La Ciudad del Niño es la comunidad con mayor porcentaje de resistencia, con 45,8%, seguido de El Árado con 28,9% y por último, en El Escobal con 25,3%
- 6 Las muestras de cerdo con 31,3% y de gallina con 22,9%, tienen los valores más altos de resistencia en las tres comunidades. Las muestras de agua con 21,7% tienen valores altos en la Ciudad del Niño y en El Árado
7. La exposición prolongada de las personas y animales al uso de inadecuado de tetraciclina, trae como consecuencia el desarrollo de resistencia a este antibiótico y un aumento de la patogenicidad en

bacterias intestinales comensales Esta resistencia es producto de la presión selectiva y posterior co-evolución en que se encuentra la bacteria dentro de su hospedero, lo que acarrea un serio problema de salud mundial.

8. La alta prevalencia de plásmidos conjugativos en muestras ambientales de *E coli*, guarda similitud con otros países y su alta incidencia, es el resultado de la actividad antropogénica en los lugares de estudio La inadecuada descarga de las heces de animales en las masas de agua, contribuye a que este sea un medio de dispersión de plásmidos que sirven como reservorios de genes de resistencia
- 9 Los genes de resistencia *tet A* y *tet B*, son los genes más comunes observados en los estudios de resistencia de *E coli* a antibióticos realizados en el mundo El gen *tet A*, es el que mantiene una alta prevalencia en estudios de muestras ambientales a nivel mundial En este trabajo se mantiene esta tendencia, aunque no hay una diferencia marcada entre las muestras ambientales de animales y agua, por lo que se piensa, que la pobre sanitización de los lugares de estudio influye en la diseminación de estos genes en el ambiente.
- 10 En animales de granja, se manifiestan los valores más altos de genes de resistencia, esto a futuro podría ser una consecuencia negativa para el país ya que estos animales son de consumo, por lo que su carne también es reservorio de genes de resistencia

# ***RECOMENDACIONES***

1. Incluir en futuras investigaciones el estudio de diferentes dosis de antibiótico para observar el efecto de la concentración mínima inhibitoria de las bacterias, con la finalidad de diagnosticar la dosis correcta de antibiótico a usar y evitar así, la adquisición de resistencia. Esto con el fin de promover programas que ayuden a la aplicación de la dosis correcta de antibióticos en los animales de granja y lograr concientizar a la población panameña de los riesgos de automedicarse.
2. Es importante considerar en futuros estudios que se involucre la selección de muestras de suelo, del tracto gastrointestinal y nasal, para hacer una evaluación integral de la exposición de las personas y animales a genes de resistencia.
3. Considerar la evaluación de residuos de antibióticos en los animales y muestras de agua, a fin de entender mejor la capacidad de respuesta antimicrobiana y compensación metabólica de la bacteria con el ambiente.
4. Promover la investigación, involucrando el estudio de mutaciones genéticas que ocurren en la bacteria para regular la expresión de genes de resistencia y observar su respuesta fisiológica como respuesta ecológica.
5. Estandarizar una PCR múltiple en tiempo real para la detección de genes de resistencia a tetraciclina y de otros antibióticos de importancia clínica y agropecuaria.
6. Relacionar los hallazgos de genes de resistencia con las diferentes patologías encontradas en las comunidades analizadas.



# ***BIBLIOGRAFÍA***

- 1 **Aarestrup, F. M., Y. Agerso, P. Gerner-Smidt, M. Madsen, y L. B. Jensen.** 2000 Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark *Diagn Microbiol Infect Dis* **32(2)**:127-37.
- 2 **Adesoji, A. T., A. A. Ogunjobi, I. O. Olatoye, y D. R. Douglas.** 2015 Prevalence of tetracycline resistance genes among multi-drug resistant bacteria from selected water distribution systems in southwestern Nigeria. *Ann Clin Microb Antimicrob* **14(35)**:1-8
- 3 **Aguavil E., J. C.** 2012 Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos Broiler Ross-308 en Santo Domingo de los Tsáchilas Escuela Politécnica del Ejército Departamento de Ciencias de la vida Tesis doctoral Ecuador Pp 7-22
- 4 **Akingbade, O., S. Balogun, D. Ojo, P. Akinduti, P. O. Okerentugba, J. C. Nwanze, y I. O. Okonko.** 2014. Resistant plasmid profile analysis of multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Abeokuta, Nigeria. *Afr Health Sci* **14(4)**:821-8
- 5 **Al-Bahry, S. N., B. M. Al-Mashani, A. S. Al-Ansari, A. E. Elshafie, y I. Y. Mahmoud.** 2013. *Escherichia coli* tetracycline efflux determinants in relation to tetracycline residues in chicken. *Asian Pac J Trop Med*.**6(9)** 718-22.
- 6 **Alexander, T. W., X. Jin, Q. Li, S. Cook, y T. A. McAllister.** 2013. Characterization of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from feedlot cattle administered therapeutic or subtherapeutic levels of tetracycline *Can J Microbiol*.**59(4)**:287-290
- 7 **Aminov, R. I.** 2009 The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol* **11(12)**:2970-88.

- 8 **Anderson, M. A., J. E. Whitlock, y V. J. Harwood.** 2006 Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle, and horses Appl Environ Microbiol **72(11)**:6914-22
- 9 **Aslam, M., M. S. Diarra, C. Service, y H. Rempel.** 2009. Antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates recovered from a commercial beef processing plant J Food Prot **72(5)**:1089-93.
- 10 **Auerbach, E. A., E. E. Seyfried, y K. D. McMahon.** 2007 Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. Water Res **41(5)**:1143-51.
- 11 **Azanza, J. R., J. Honorato, y A. Mediavilla.** 1997 Tetraciclinas, Cloranfenicol y otros antibióticos, Pp 1131-5 In: J. Flores, Armijo, J A., Mediavilla, A (ed) Farmacología Humana 3ª ed Editora Masson, S.A., España
- 12 **Bailey, J. K., J. L. Pinyon, S. Anantham, y R. M. Hall.** 2010 Commensal *Escherichia coli* of healthy humans a reservoir for antibiotic-resistance determinants J Med Microbiol. **59(11)** 1331-9.
- 13 **Beceiro, A., M. Tomás, y G. Bou.** 2012. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? Enferm Infecc Microbiol Clin **30(8)**:492-9
- 14 **Bryan, A., N. Shapir, y M. J. Sadowsky.** 2004 Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources Appl Environ Microbiol **70(4)**:2503-7
- 15 **Capkin, E., E. Terzi, y I. Altinok.** 2015 Occurrence of antibiotic resistance genes in culturable bacteria isolated from Turkish trout farms and their local aquatic environment Dis Aquat Organ **114(2)**:127-37.

- 16 **Cernat, R., V. Lazăr, C. Balotescu, A. Cotar, E. Coipan, y C. Cojocaru.** 2002 Distribution and diversity of conjugative plasmids among some multiple antibiotic resistant *E. coli* strains isolated from river waters. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* **47(3-4)**:147-53
- 17 **Chopra, I., y M. Roberts.** 2001 Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance *Microbiol Mol Biol Rev.***65(2)**:232-60.
- 18 **CIDRAP.** 2010 NEWS SCAN: Panama braces for cholera, *E coli* cheese recall, TB in prisons, farm antibiotics
- 19 **Clermont, O., S. Bonacorsi, y E. Bingen.** 2000 Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group *Appl Environ Microbiol.***66(10)**:4555-8.
- 20 **Costa, D., P. Poeta, Y. Sáenz, L. Vinué, A. C. Coelho, M. Matos, B. Rojo-Bezares, J. Rodríguez, y C. Torres.** 2008 Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Microb Drug Resist.***14(1)** 71-7.
- 21 **Costa, M. M., G. Drescher, F. Maboni, S. S. Weber, A. Schrank, M. H. Vainstein, I. S. Schrank, y A. C. Vargas.** 2010 Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms *Arq Bras Med Vet Zootec.***62(1)**:30-6
- 22 **de Jong, A., V. Thomas, S. Simjee, K. Godinho, B. Schiessl, U. Klein, P. Butty, M. Vallé, H. Marion, y T. R. Shryock.** 2012 Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals *J Antimicrob Chemother* **67**.638–51
- 23 **Diamant, E., Y. Palti, R. Gur-Arie, H. Cohen, E. M. Hallerman, y Y. Kashi.** 2004 Phylogeny and strain typing of *Escherichia coli*, inferred

- from variation at mononucleotide repeat loci Appl Environ Microbiol **70(4)**:2464-73
- 24 **Duan, H., T. Chai, J. Liu, X. Zhang, C. Qi, J. Gao, Y. Wang, Y. Cai, Z. Miao, M. Yao, y G. Schlenker.** 2009 Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. Environ Res.**109** 511-2
- 25 **Errecalde, J. O.** 2004 Uso de antimicrobianos en animales de consumo incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública FAO· producción y sanidad animal.**162** 1-60
- 26 **Esalava Campos, C. A., A. Navarro Ocaña, U. Hernández Chiñas, y E. P. Salazar Jiménez.** 2004 *Escherichia coli* microorganismo divergente con actitud dual en su relación de convivencia con sus hospederos Citado en [http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/ourprofs/ecoli\\_divergente.htm](http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/ourprofs/ecoli_divergente.htm)
- 27 **FAO.** 2012. Prevención de la *E coli* en los alimentos [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/Preventing\\_Ecolies.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecolies.pdf)
- 28 **Frye, J.G., y C.R. Jackson.** 2013 Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp isolated from U.S. food animals. Fron Microbiol **135(4)**:1-22
- 29 **García Hernández, A.M., E. García Vásquez, A. Hernández Torres, J. Ruiz, G. Yagüe, J.A. Herrero, y J. Gómez.** 2011. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) significación clínica y perspectivas actuales Rev Esp Quimioter **24(2)**:57-66
- 30 **Guardabassi, L., L. Dijkshoorn, J.M. Collard, J.E. Olsen, y A. Dalsgaard.** 2000. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline

- resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains  
J Med Microbiol **49**:929-36
- 31 **Iáñez, E.** 1998 Quimioterápicos de síntesis y antibióticos Citado en  
[http //www.biologia.edu ar/microgeneral/micro-ianez/20\\_micro htm#intro](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/20_micro.htm#intro)
- 32 **Jara, M.R.** 2007 Tetraciclinas un modelo de resistencia antimicrobiana Av Cs Vet.**22** 49-55
- 33 **Jackson, C. R., J. A. Davis, J. G. Frye, J. B. Barrett, y L. M. Hiott.** 2015. Diversity of plasmids and antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from healthy companion animals Zoonoses Public Health **62(6)**:479-88.
- 34 **Jernberg, C., S. Löfmark, C. Edlund, y J. K. Jansson.** 2010 Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota Microbiology **156(11)**:3216-23
- 35 **Jia, S., X. He, Y. Bu, P. Shi, Y. Miao, H. Zhou, Z. Shan, y X. X. Zhang.** 2014. Environmental fate of tetracycline resistance genes originating from swine feedlots in river water J Environ Sci Health B **49(8)**:624-31.
- 36 **Jones, C. H., M. Tuckman, E. Murphy, y P. A. Bradford.** 2006 Identification and sequence of a *tet(M)* tetracycline resistance determinant homologue in clinical isolates of *Escherichia coli*. J Bacteriol **188(20)**:151-64
- 37 **Kaesbohrer, A., A. Schroeter, B. A. Tenhagen, K. Alt, B. Guerra, y B. Appel.** 2012. Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance Zoonoses Public Health **59(2)**:158-65
- 38 **Kanwar, N., H. M. Scott, B. Norby, G. H. Loneragan, J. Vinasco, M. McGowan, J. L. Cottell, M. M. Chengappa, J. Bai, y P. Boerlin** 2013 Effects of ceftiofur and chlortetracycline treatment strategies on

- antimicrobial susceptibility and on *tet(A)*, *tet(B)*, and *blaCMY-2* resistance genes among *E. coli* isolated from the feces of feedlot cattle PLoS ONE. **8(11)**:e80575 (1-13)
- 39 **Karami, N., F. Nowrouzian, I. Adlerberth, y A. E. Wold.** 2006 Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota Antimicrob Agents Chemothe **50(1)** 156–61
- 40 **Koo, H. J., y G. J. Woo.** 2011. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products Int J Food Microbiol **145(2-3)**:407-13.
- 41 **Kozak, G. K., P. Boerlin, N. Janecko, R. J. Reid-Smith, y C. Jardine.** 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada Appl Environ Microbiol. **75(3)**:559–66
- 42 **Król, J. E., A. J. Wojtowicz, L. M. Rogers, H. Heuer, K. Smalla, S. M. Krone, y E. M. Top.** 2013 Invasion of *E. coli* biofilms by antibiotic resistance plasmids Plasmid **70(1)**:110-19
- 43 **Ley, R. E., C. A. Lozupone, M. Hamady, R. Knight, y J. I. Gordon.** 2008. Worlds within worlds Evolution of the vertebrate gut microbiota Nat Rev Microbiol. **6(10)**:776–88
- 44 **Linton, A. H.** 1988 Plasmids in the environment Schriftenr Ver Wasser Boden Luft Hyg **78**:197-224
- 45 **Looff, T. P.** 2012 The swine intestinal microbiota. localized adaptations and responses to in-feed antibiotics. Universidad Estatal de Iowa. Tesis doctoral Estados Unidos Pp. 3-20
- 46 **Liu, Z., Z. Zhang, H. Yan, J. Li, y L. Shi.** 2015 Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant Enterobacteriaceae strains from pork and environmental samples in Xiamen, China J Food Prot **78(1)**:78-88.

- 47 **Marshall, B. M., y S. B. Levy.** 2011 Food animals and antimicrobials Impacts on human health Clin Microbiol Rev. **24(4)**:718-33.
- 48 **Medina Asensio, J.** 2000 Resistencia bacteriana a los antibióticos, p 58-9 In J Medina Asencio (ed). Guía de antimicrobianos y tratamiento de las infecciones 2ª edición Ediciones Díaz de Santos, S A. Madrid, España.
- 49 **Medina, A. E.** 2011 Resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina Facultad de Veterinaria Departamento de Sanidad Animal Universidad Complutense de Madrid, España Pp. 3-13.
- 50 **Momtaz, H., E. Rahimi, y S. Moshkelani.** 2012. Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E coli* isolated from slaughtered commercial chickens in Iran Vet Med-Czech **57(4)**:193-7
- 51 **Morejón G., M., R. Salup D., y M. Cué B.** 2003. Actualización en tetraciclinas Rev Cubana Farm **37(3)**: Citado en [http //www bvs sld.cu/revistas/far/vol37\\_3\\_03/far08303 htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol37_3_03/far08303.htm)
- 52 **Mosquito, S., J. Ruíz, J.L. Bauer, y T.J. Ochoa.** 2011 Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Pública **28(4)**:648-56
- 53 **Ng, L.K., I. Martin, M. Alfa, y M. Mulvey.** 2001 Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes Mol Cell Probes **15(4)**:209-15
- 54 **Núñez, L., C. Tornello, N. Puentes, y J. Moretton.** 2012. Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario Ambi - Agua. **7(1)**:235-43
- 55 **OMS.** 2000. WHO issues: New recommendations to protect human health from antimicrobial use in food animals Citado en. [http //www who int/inf-pr-2000/en/pr2000-43 html](http://www.who.int/inf-pr-2000/en/pr2000-43.html)



- 56 **OMS.** 2001 Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos Suiza Citado en [http //www antibioticos.msc.es/PDF/resist\\_OMS\\_estrategia\\_mundial \\_contra\\_resistencias.pdf](http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf)
- 57 **OMS.** 2012 The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action. Citado en [http //apps.who int/iris/bitstream/10665/44812/1/9789241503181 \\_eng pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44812/1/9789241503181_eng.pdf?ua=1)
- 58 **OPS.** 2009 Informe Anual de la Red de Monitoreo Vigilancia de la resistencia a los antibióticos Washington, D.C citado en. [http //www paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_ view&gid=14877&Itemid=4104](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=14877&Itemid=4104)
- 59 **Pantozzi, F. L., F. A. Moredo, G. B. Vigo, y G. I. Giacoboni.** 2010 Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina Rev Argent Microbiol **42(1)**:49-52
- 60 **Pérez-Trallero, E., y L. Iglesias.** 2003 Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol Enferm Infecc Microbiol Clin **21(9)**:520-3.
- 61 **Periago, M. R.** 2011. La resistencia a los antimicrobianos: un factor de riesgo para las enfermedades infecciosas Rev Panam Salud Pública.**30(6)**:507-8.
- 62 **Poole, K.** 2005 Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother **56**:20–51
- 63 **Quian, Y., D. Yue, Y. Peng, Y. Liu, y L. Xiao.** 2013 Occurrence and distribution of antibiotic-resistant bacteria and transfer of resistance genes in Lake Taihu. Microbes Environ.**28(4)**:479-86
- 64 **Redondo, C., y G. Alonso.** 2007 Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas Rev Soc Ven Microbiol.**27(2)**:100-7

- 65 **Ríos T., A. M.** 2012 Caracterización de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos y quinolonas en cepas de *E. coli* aisladas de la microbiota intestinal humana Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. Pp 27-62
- 66 **Roberts, M. C.** 1996 Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution FEMS Microbiol Rev. **19(1)**:1-24
- 67 **Rodríguez R., M. A., J. G. González-Piñera, J. Barreto Penié, N. Lim Alonso, A. Areu, y A. Pardo Núñez.** 1998 Tetraciclinas. Acta Med **8(1)**:75-9
- 68 **Rolain, J.** 2013 Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes Front Microbiol. **173(4)**:1-10
- 69 **Sambrook, J., y D. W. Russell.** 2012 Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS Miniprep Pp 11-14 In K Janssen y J Argentine (eds ) Molecular cloning. a laboratory manual. 4ª edición Cold Spring Harbour Laboratory Press, United States
- 70 **Santamaría, J., L. López, y C. Y. Soto.** 2011 Detection and diversity evaluation of tetracycline resistance genes in grassland-based production systems in Colombia, South America Front Microbiol **252(2)**:1-9
- 71 **Sayah, R. S., J. B. Kaneene, I. Johnson, y R. Miller.** 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild animal fecal samples, human septage, and surface water Appl Environ Microbiol. **71(3)**:1394-1403.
- 72 **Savage, D. C.** 1977 Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annu Rev Microbiol **31**:107-33
- 73 **Schuermans, J. M., S. van Hijum, J. R. Piet, N. Händel, J. Smelt, S. Brul y B. H. ter Kuile.** 2014 Effect of growth rate and selection

pressure on rates of transfer of an antibiotic resistance plasmid between *E. coli* strains Plasmid. **72**:1-8

- 74 **Soslan, G.** 2000 ADN recombinante y biotecnología, Pp 768-70 In T M Devlin (ed ). Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas Volumen 2 3ª edición Editorial Reverté, S A , España
- 75 **Stewardson, A. J., B. Huttner, y S. Harbarth.** 2011 At least it won't hurt. the personal risks of antibiotic exposure Curr Opin Pharmacol **11**(5):446-52
- 76 **Sun, C., y H. Wu.** 2012. Pollution from animal husbandry in China a case study of the Han River Basin Water Sci Technol **66**(4):872-8
- 77 **Sussmann P., O. A., L. Mattos, y A. Restrepo.** 2002 Resistencia bacteriana. Univ Méd Bogotá Colombia **43**(1):91-6.
- 78 **Talukdar, P. K., M. Rahman, M. Rahman, A. Nabi, Z. Islam, M. Mahfuzul Hoque, H. P. Endtz, y M. A. Islam.** 2013 Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from household water supply in Dhaka, Bangladesh PLoS ONE **8**(4):1-8.
- 79 **Torres, A. G., M. Arenas-Hernández, y Y. Martínez-Laguna.** 2010 Overview of *Escherichia coli*, Pp 1-7. In A.G Torres (ed ) Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America Capítulo I Bentham Science Publishers Ltd Estados Unidos
- 80 **Tuckman, M, P. J. Petersen, A. Y. M. Howe, M. Orlowski, S. Mullen, K. Chan, P. A. Bradford, y C. Hal Jones.** 2007. Occurrence of tetracycline resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. Antimicrob Agents Chemother **51**(9):3205-11.
- 81 **Usui, M., T. Shirakawa, A. Fukuda, y Y. Tamura.** 2015. The role of flies in disseminating plasmids with antimicrobial-resistance genes between farms Microb Drug Resist **21**(5):562-9

- 82 **Vacca, C. P., C. Y. Niño, y L. Revelz.** 2011 Restricción de la venta de antibióticos en farmacias de Bogotá, Colombia estudio descriptivo Rev Panam Salud Pública **30(6)**:586-7
- 83 **Van der Horst, M. A., T. H. Fabri, J. M. Schuurmans, B. B. Koenders, S. Brul, y B. H. ter Kuile.** 2013 Effects of therapeutical and reduced levels of antibiotics on the fraction of antibiotic resistant strains of *Escherichia coli* in the chicken gut Foodborne Path Dis **10(1)**: 1-7
- 84 **Vergara, C., J. Visbal, y S. Máttar** 2002 Serotipia, resistencia a antimicrobianos y perfiles plasmídicos de bacterias enteropatógenas aisladas de procesos diarreicos de Colombia MVZ-CÓRDOBA.**7(2)**:211-5
- 85 **Vives, E. A., M. V. Ventriglia, D. Medvedovsky, M. L. Oyarbide, G. Pérez Marc, M. V. Gacitúa, M. Poggi, y R. Rothlin.** 2004 Farmacología II Inhibidores de la síntesis proteica ribosomal. Citado en.  
[http://sel.quimica uady.mx/courses/FARMAII/document/documentos\\_de\\_apoyo\\_primer\\_parcial/inhibidores-de-la-sintesis-proteica-ribosomal.pdf](http://sel.quimica uady.mx/courses/FARMAII/document/documentos_de_apoyo_primer_parcial/inhibidores-de-la-sintesis-proteica-ribosomal.pdf)
- 86 **Wang, C., X. Gu, S. Zhang, P. Wang, C. Guo, J. Gu, y J. Hou.** 2013 Characterization of antibiotic-resistance genes in antibiotic resistance *Escherichia coli* isolates from a lake. Arch Environ Contam Toxicol **65(4)**:635-41
- 87 **Wasył, D., A. Hoszowski, M. Zajac, y K. Szulowski.** 2013. Antimicrobial resistance in comensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter Front Microbiol.**221(4)**.1-12
- 88 **Wilkerson, C., M. Samadpour, N. van Kirk, y M. C. Roberts.** 2004. Antibiotic resistance and distribution of tetracycline resistance in

- Escherichia coli* O157 H7 isolates from humans and bovines  
Antimicrob Agents Chemother **48(3)**:1066-7
- 89 **Xi, X., J. Zhang, L. Kwok, D. Huo, S. Feng, H. Zhang, y T. Sun.**  
2015 Microbial pollution tracking of dairy farm with a combined PCR-  
DGGE and qPCR approach Curr Microbiol **71(6)**:678-86
- 90 **Yee, Y. y G. Batista.** 2010. Patrones de resistencia antimicrobiana en  
cepas de *Escherichia coli* procedentes de muestras fecales y de aguas  
Universidad de Panamá Tesis de licenciatura Panamá. Pp 9-62
- 91 **Zambrano, J. L., L. Botero, M. E. Cavazza, y M. Ávila.** 2002  
Resistencia a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de  
*Escherichia coli* aisladas de aguas residuales crudas y tratadas por  
lagunas de estabilización con fines de reúso en agricultura Rev Soc  
Ven Microbiol **22(1)** 44-50
- 92 **Zhang, A., X. He, Y. Meng, L. Guo, M. Long, H. Yu, B. Li, L. Fan, S.  
Liu, H. Wang y L. Zou.** 2015. Antibiotic and disinfectant resistance of  
*Escherichia coli* isolated from retail meats in Sichuan, China Microb  
Drug Resist **22(1)** 80-7
- 93 **Zhang, S. H., X. Lv, B. Han, X. Gu, P. F. Wang, C. Wang, y Z. He.**  
2015 Prevalence of antibiotic resistance genes in antibiotic resistant  
*Escherichia coli* isolates in surface water of Taihu Lake Basin, China  
Environ Sci Pollut Res Int **22(15)**:11412-21